

**Konzeption und Entwicklung eines Mausmodells
zur Präeklampsie
mit Variation und Blockierung der Ligand/ sFlt-1 Interaktion**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

**von Astrid Bergmann
aus Dresden**

1. Referent: Privatdozent Dr. Gerhard Gross
2. Referent: Professor Dr. Jürgen Wehland
eingereicht am: 19.03.2008
mündliche Prüfung (Disputation) am: 20.06.2008

Druckjahr 2008

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Bergmann, A., Ahmad, S., Cudmore, M.J., Gruber, A., Wittschen, P., Lindenmaier, W., Christophori, G., Gross, V., Costa Gonzalvez, A.C., Gröne, H.J., Ahmed, A., Weich, H.A. Reduction of circulating soluble Flt-1 alleviates preeclamptic-like symptoms. *Kidney* (2008). *submitted*

Tagungsbeiträge

Bergmann A, Lindenmaier W., Gruber A., Christophori G., Weich HA. Preeclampsia : A new mouse model for sFlt-1-mediated symptoms including liver toxicity, glomerular dysfunction and Proteinuria after short-time treatment. (Poster) The 3rd International Meeting on Angiogenesis. Amsterdam, Niederlande (2007)

Bergmann A, Shibuya M., Lindenmaier W., Christophori G., Weich HA. A mouse model for glomerular dysfunction: Preeclampsia-like symptoms evoked by adenoviral sFlt-1/ VEGFR-1 overexpression. (Poster) The 4th International Kloster Seeon Meeting on Angiogenesis. Seeon, Deutschland. (2006)

Bergmann A, Shibuya M., Lindenmaier W., Christophori G., Weich HA. Adenoviral overexpression of sFlt-1/ VEGFR-1 mediates glomerular dysfunction in a mouse model for preeclampsia. (Poster) The 4th ESH Euroconference on Animal Models of Human Malignancies and Biotherapies. Budapest, Ungarn. (2005)

Bergmann A, Shibuya M., Lindenmaier W., Weich HA.. Establishing of a mouse model for preeclampsia as vascular disease. (Poster) The 5th International Symposium on the Biology of Endothelial Cells. Dresden, Deutschland. (2005)

Bergmann A, Shibuya M., Lindenmaier W., Weich HA. Adenoviral overexpression of soluble FLT-1/ VEGFR-1 as a mouse model for preeclampsia. (Poster) The 3rd International Kloster Seeon Meeting on Angiogenesis. Seeon, Deutschland. (2004)

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
1.	Das Blutgefäßsystem	1
1.1	Das Endothel	1
2.	Die Schwangerschaft und der Aufbau der Plazenta	2
2.1	Die normale Schwangerschaft	2
2.1.1	Veränderungen im mütterlichen Organismus	2
2.1.2	Implantation des befruchteten Eies und Veränderungen der uterinen Gefäßstruktur	2
2.1.3	Die Rolle des VEGF-A und des VEGFR-1/ Flt-1 bei der Plazentaentwicklung	5
2.2	Die pathologische Schwangerschaft	6
3.	Präeklampsie	6
3.1	Präeklampsie als Hypothese der endothelialen Dysfunktion	7
3.2	Schwangerschaftsbedingte Veränderungen im sVEGFR-1/sFlt-1, VEGF-A, und PlGF Spiegel	8
4.	Das VEGF-Rezeptorsystem	10
4.1	Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor A	11
4.2	Weitere Liganden der VEGF-Familie	12
4.3	Die Rezeptoren der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren	13
4.3.1	Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor Rezeptor 1 (VEGFR-1/ Flt-1)	14
4.3.2	Der lösliche vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor Rezeptor 1 (sVEGFR-1/ sFlt-1)	16
4.3.3	Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor Rezeptor 2 (VEGFR-2/ KDR/ Flk-1)	17
4.3.4	Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor Rezeptor 3 (VEGFR-3/ Flt-4)	18
5.	Der physiologische Hintergrund des Tiermodells	19
5.1	Das Symptom Nierenschädigung und Proteinurie	20
5.2	Das Symptom Blutdruckanstieg	21
6.	Adenoviren und adenoviraler Gentransfer	22
6.1	Rekombinante Adenoviren	23
7.	Blockierende Antikörper	24
II	Zielsetzung der vorliegenden Dissertation	25

III	Material und Methoden	26
1.	Material	26
1.1	Chemikalien, Puffer und Lösungen	26
1.2	Verwendete <i>E.coli</i> – Stämme	26
1.3	Humane Zelllinien	26
1.4	Adenovirale Konstrukte	27
1.5	Oligonukleotidsequenzen	28
1.6	Antikörper	29
2.	Methoden	30
2.1	Isolation von Nukleinsäuren	30
2.2	Die Synthese von cDNS	31
2.3	Die Phenol-Chloroform-Fällung	32
2.4	Die Restriktion von DNS	32
2.5	Die Ligation von Fragmenten	32
2.6	Die Transformation von DNS in kompetente Zellen	33
2.7	Die Herstellung von kompetenten Zellen	34
2.8	Die Herstellung von Glyzerolkulturen	34
2.9	Die RT-PCR und die Sequenzierung	35
2.10	Die elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	35
3.	Proteinchemische Methoden	37
3.1	Die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay	37
3.2	Die Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE	37
3.3	Der Nachweis von Gesamtprotein mittels Silberfärbung	37
3.4	Der spezifische Proteinnachweis im Western-Blot	38
3.5	Der spezifische quantitative Proteinnachweis im ELISA	38
3.6	Der spezifische quantitative Proteinnachweis von bioaktivem VEGF-A im RELIDA	40
3.7	Die Herstellung von Gewebelysaten	40
3.8	Die Depletion von murinem sFlt-1 aus Plasma	41
4.	Zellkultur	41
4.1	Die Kultivierung von 293HEK-Zellen	41
4.2	Die Kultivierung von A549-Zellen	42
4.3	Die Kryokonservierung und das Auftauen von Zellen	42
5.	Adenovirusherstellung	43
5.1	Die Anreicherung von Adenoviren	43
5.2	Die Aufreinigung von Adenoviren	45
5.3	Die Titerbestimmung von Adenoviren	46
5.4	Der Nachweis des adenoviral überexprimierten Proteins	48
6.	Das Mausmodell	49
7.	Statistik	51

IV	Ergebnisse	52
1.	Entwicklung eines neutralisierenden einzelkettigen Antikörpers	52
1.1	Blockierende Antikörper	52
1.2	Immunisierung von Mäusen	53
1.3	Herstellung des einzelkettigen Antikörpers (scFv)	55
2.	Produktion von rekombinanten Adenoviren	59
2.1	Mikroskopische Kontrolle der Funktionalität	60
2.2	Qualitativer Nachweis adenoviral exprimierten Proteins	62
2.3	Quantitativer Nachweis adenoviral exprimierten Proteins	63
3.	Das Mausmodell	65
3.1	Simulation eines Präeklampsie-ähnlichen Zustandes als Folge der systemischen Inhibierung von VEGF-A in der Maus	66
3.1.1	Nachweis exogener Transkripte in Lebergewebe	66
3.1.2	Nachweis exogener Proteine in der Zirkulation und Geweben	67
3.1.3	Morphologische Veränderungen von Leber und Milz	74
3.1.4	Histologische Veränderungen der Niere nach sFlt-1 Überexpression	78
3.1.5	Veränderte Albuminkonzentration im Harn nach sFlt-1 Überexpression	88
3.1.6	Veränderung des Blutdrucks nach sFlt-1 Überexpression	92
3.1.7	Überexpression von sFlt-1 in trächtigen Tieren	96
3.2.	Blockierung der induzierten sFlt-1 Aktivität im Präeklampsie-Modell	97
3.2.1	Bindungsstudien zur Komplexbildung von adenoviral exprimiertem sFlt-1 durch co-exprimiertes VEGF-A nach Infektion von A549-Zellen	97
3.2.2	Nachweis exogener Proteine in der Zirkulation und im Gewebe nach sFlt-1/ VEGF-A Co-Expression	107
3.2.3	Morphologische Veränderungen von Leber und Milz nach sFlt-1/ VEGF-A Co-Expression	112
3.2.4	Histologische Veränderungen der Niere nach sFlt-1/ VEGF-A Co-Expression	114
3.2.5	Veränderung der Albuminkonzentration im Harn nach sFlt-1/ VEGF-A Co-Expression	116
3.2.6	Einfluß der Co-Expression von sFlt-1/ VEGF-A auf den Blutdruck	121
3.2.7	Bindungsstudien zur Komplexbildung von adenoviral exprimiertem sFlt-1 durch den neutralisierenden anti-Flt-1 Antikörper KM1750	124
3.2.8	Einfluß der Co-Administration des neutralisierenden anti-Flt-1 Antikörpers KM1750 auf sFlt-1 induzierte Effekte im Tiermodell	126
3.3	Genexpression	127
3.4	Therapeutische Optionen	128

V	Diskussion	131
4.1	Das Mausmodell	131
4.2	Die Bedeutung von sFlt-1 für die Plazenta	133
4.3	Die Überexpression von sFlt-1 induziert Präeklampsie-ähnliche Symptome	138
4.3.1	Die Überexpression von sFlt-1 induziert glomeruläre Endotheliose	138
4.3.2	Die Überexpression von sFlt-1 induziert Proteinurie	142
4.3.3	Die Überexpression von sFlt-1 induziert Hypertension	146
4.4	Die Co-Transfektion von VEGF-A ₁₆₅ vermindert <i>in-vivo</i> sFlt-1 induzierte Symptome	149
VI	Ausblick	152
VII	Zusammenfassung	155
VIII	Anhang	158
1.	Abkürzungsverzeichnis	158
2.	Tabellen und Abbildungen	159
3.	Literaturverzeichnis	163
4.	Danksagung	174
IX	Curriculum Vitae	175

I. Einleitung

1. Das Blutgefäßsystem

Das Blutgefäßsystem vernetzt die Regionen des Körpers untereinander. Es gewährleistet sowohl die Versorgung der Gewebe mit Nährstoffen und Sauerstoff als auch den Transport von Zellgiften, und stellt somit eines der wichtigsten Systeme des Organismus dar (Shibuya et al. 2001). In Vertebraten ist die Bildung des vaskulären Systems die Voraussetzung für die Embryogenese und setzt sich aus zwei fundamentalen Prozessen zusammen: Die Vaskulogenese, die als Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen und deren Verbindung in primäre kapilläre Plexi definiert ist, und die Angiogenese, die Bildung neuer Kapillaren aus bereits existierenden heraus (Holmes et al. 2005).

Die Entwicklung des vaskulären Systems ist einer der ersten Prozesse in der Organbildung. Hämangioblasten differenzieren unter dem Einfluß proangiogener Faktoren zu Angioblasten, die aggregieren und so primitive vaskuläre Plexi bilden. Nach Proliferation und weiterer Differenzierung entstehen aus diesen Plexi Lumen, die von Endothel ausgekleidet und von einer Basalmembran umgeben sind. Der Einbau von Perizyten schließt die Gefäßbildung ab und sorgt für Festigkeit und Stabilität, die Blutzirkulation beginnt. Zur Regulation des Blutdrucks sind Arterien und Venen zusätzlich von einer glatten Muskelschicht umgeben (Coultas et al. 2005).

In der Angiogenese entstehen Gefäße durch Knospung in Richtung eines proangiogenen Stimulus. Dabei werden Zellkontakte aufgelöst, die Basalmembran destabilisiert und Zellen des Endothels migrieren in Richtung des Stimulus, wo sie proliferieren und auf diese Weise der Neubau der Gefäße erfolgt (Ramsauer et al. 2002).

Im adulten Organismus ist die Angiogenese essentiell während der Schwangerschaft, dem Gewebswachstum und der Gewebsinstandhaltung, sowie als Schlüsselprozeß der Pathogenese sämtlicher häufig auftretender humaner Erkrankungen wie solider Tumoren oder Arteriosklerose (Holmes et al. 2005).

1.1 Das Endothel

Aufgrund seiner Lage zwischen Blutstrom und solidem Gewebe erfüllt das Endothel eine Reihe von hochdifferenzierten Aufgaben. Diese betreffen hauptsächlich die Regulation des vaskulären Tonus und die Kontrolle der Aktivierung der glatten Muskelzellen. Das Endothel kontrolliert die Permeabilität und Thrombogenität der Gefäße und kann inflammatorische und immunologische Prozesse modulieren. Diese Vorgänge werden durch eine Vielzahl von

Molekülen gesteuert, die vom Endothel teilweise selbst gebildet werden. Dazu gehören vasoaktive Substanzen die dilatierend (Stickstoffmonoxid, Prostacyclin) oder kontraktierend (Endothelin, Angiotensin II) wirken, aber auch Wachstumsfaktoren und Zytokine (PDGF, VEGF, bGFG, TGF-beta), oder inflammatorische Modulatoren (ICAM, VCAM) (Kroll et al. 2000).

2. Die Schwangerschaft und der Aufbau der Plazenta

2.1. Die normale Schwangerschaft

2.1.1 Veränderungen im mütterlichen Organismus

Während einer Schwangerschaft beginnen die Veränderungen im mütterlichen Organismus im ersten Trimenon. Neben starken Abweichungen im Hormonhaushalt kommt es aufgrund des erhöhten Umsatzes zur Steigerung des Atemvolumens und der Atemfrequenz, sowie einer verstärkten glomerulären Filtrationsrate in der Niere. Die Erhöhung des Blutvolumens um 30% ist mit einer relativen Blutverdünnung verbunden, die sich positiv auf die Fließeigenschaften des Blutes und damit auf die Perfusion von Uterus und Plazenta auswirkt. Gleichzeitig führt der Anstieg des Blutvolumens zu einer Steigerung des Herz-Minuten-Volumens. Der Blutdruck fällt im ersten und zweiten Trimenon leicht ab, und steigt im letzten Trimenon wieder leicht an (Goerke et al. 2002).

2.1.2 Implantation des befruchteten Eies und Veränderungen des uterinen Gefäßsystems

Nach der Vereinigung der beiden Kerne von Ei- und Samenzelle kommt es zu Zellteilungen, und über das Morula-Stadium entsteht die Blastozyste, die den Embryoblasten enthält und nach fünf bis sechs Tagen in den Uterus einwandert. Dort nistet sie sich in die zyklisch frisch aufgebaute Schicht des Endometriums ein. Der Embryoblast ist von einer Zellschicht, den Trophoblasten umgeben, die nach der Implantation in zwei Anteile differenzieren: Den einen Teil bilden die Trophoblasten, die dem Uteruslumen zugewandt sind und als villöse Zytotrophoblasten im fötalen Kompartiment verbleiben. Sie fusionieren nach Differenzierung zu mehrkernigen Synzytiotrophoblasten, die das spätere Oberflächenepithel der Plazenta, die Chorionzotten, ummanteln. Diese Zotten stehen in direktem Kontakt mit dem intervillösen Raum und versorgen den Fötus mit Nährstoffen und Sauerstoff, den sie aus dem sie umspülenden maternalen Blut aufnehmen. Den anderen Teil bilden die Trophoblasten, die dem Endometrium zugewandt sind und zu extravillösen Synzytiotrophoblasten differenzieren.

Sie sezernieren matrix-degenerierende Proteasen und migrieren so tiefer in das Endometrium. Auf diese Weise wird der Fötus im Endometrium verankert. Nach weiterer Infiltration verflechten diese Zellen mit dem mütterlichen Endothel und bilden flüssigkeitsgefüllte Lakunen. Um den Fötus mit dem Blutkreislauf der Mutter zu verbinden, werden maternale Arteriolen und Venolen des Endometriums arrodirt und geöffnet. Diese werden später zu Spiralarterien und Spiralvenen erweitert. Mit dem Einstromen des mütterlichen Blutes in die Lakunen beginnt der uteroplazentare Kreislauf (Iruela-Arispe et al. 1999, Zhou et al. 1997a, Goerke et al. 2002). Im Rahmen dieses Kreislaufs nimmt der Fötus Stoffe wie Vitamine, Immunglobulin G, einige Hormone, Elektrolyte, einige Aminosäuren oder Glucose aus dem Blut der Mutter auf und gibt neben Zytokinen wie VEGF-A und PlGF, oder löslichen Rezeptoren auch Abbauprodukte wie Bilirubin und Harnstoff, sowie Laktat, Bikarbonat, Kohlensäure und Wasser in das Blut der Mutter ab (Kaufmann et al. 1993).

Das schnelle Wachstum der Plazenta kann mit dem rasanten Wachstum von neoplastischem Gewebe verglichen werden (pers. Kommunikation, Dr. Herbert A. Weich). Um die Versorgung der schnell wachsenden Plazenta zu gewährleisten, muss das zirkulierende Blutvolumen angepasst werden. Aus diesem Grund wird das Lumen der Spiralarterien, die das Kind mit mütterlichem Blut versorgen, während der Schwangerschaft ständig erweitert. Das geschieht über extravillöse Synzytiotrophoblasten, die die fötale Umgebung verlassen und in die Gefäße einwandern. Sie ersetzen das maternale Endothel, und kolonisieren so die mütterlichen Spiralgefäße. Im Rahmen dieser endovaskulären Invasion zeigen die Synzytiotrophoblasten eine verstärkte Expression endothelialer Adhisionsmoleküle wie VCAM-1 und PECAM-1, während die Expression epithelialer Marker wie E-cadherin abnimmt. Der Charakter dieser Zellen konvertiert von epithelial zu endothelial. Da die Kolonisierung der Spiralarterien mit diesen Zellen keine echte Vaskulogenese darstellt, wird dieser Vorgang als Pseudovaskulogenese bezeichnet (Iruela-Arispe et al. 1999, Zhou et al. 1997, Goerke et al. 2002).

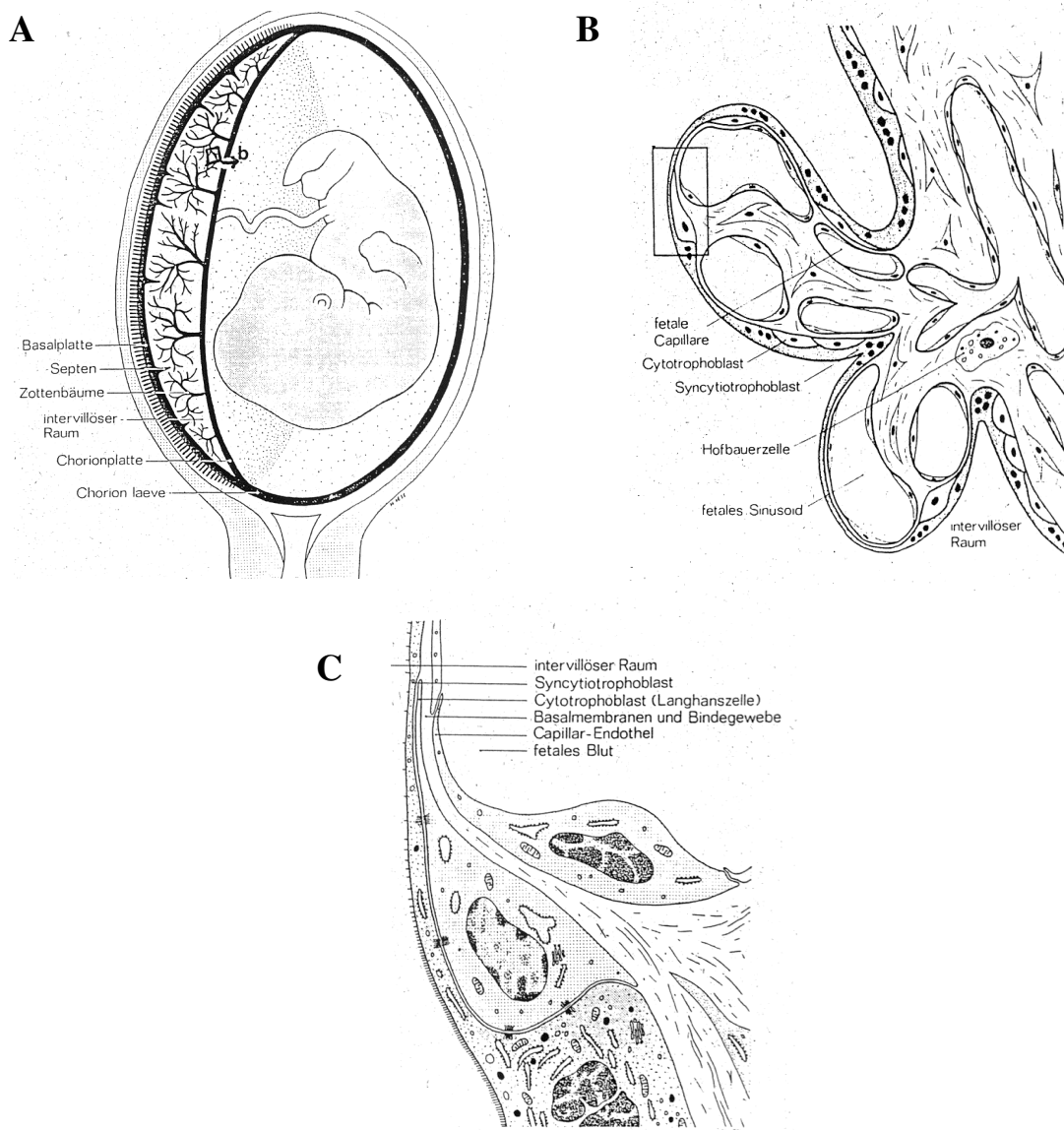


Abb. I.1: Der Aufbau des Uterus und der Plazenta.

A) Aufbau des Uterus: Der Embryo befindet sich in der Chorionhöhle und ist durch die Nabelschnur mit der Plazenta (rot) verbunden. Die Plazenta besteht aus Zottenbäumen, die in den intervillösen Raum zwischen mütterlicher Basalplatte (Decidua) und fetaler Chorionplatte hineinragen und dort von mütterlichem Blut umflossen werden. **B)** Die Zotten sind von einer Zellschicht umgeben, den Synzytiotrophoblasten (grün). Über diese Trophoblastenschicht findet der Stoffaustausch mit der Mutter statt. Die Synzytiotrophoblasten repräsentieren also die Grenze zwischen Mutter und Fötus, der direkte Kontakt zwischen mütterlichem und fötalem Blut wird so umgangen. Plazentales Gewebe enthält ebenfalls Makrophagen (Hofbauerzellen). **C)** In der schematischen Vergrößerung aus B) wird der mehrkernige Synzytiotrophoblast (grün) hervorgehoben, der durch Fusion der darunter liegenden einkernigen Zytotrophoblasten (blau) entsteht. Des Weiteren enthält plazentales Gewebe interstitielles Bindegewebe und Basalmembranen (Kaufmann et al. 1993).

2.1.3 Die Rolle des VEGF-A und des VEGFR-1/ Flt-1 bei der Plazentaentwicklung

Die plazentare Entwicklung ist durch eine starke Vaskularisierung gekennzeichnet, die 21 Tage nach der Empfängnis beginnt. Während des ersten Trimesters initiieren Zytotrophoblasten die Vaskulo- und Angiogenese, später übernehmen Makrophagen und Stromazellen in der Plazenta diese Funktion (Demir et al. 2007). Die gefäßbildenden Prozesse werden durch die Sekretion eines Zytokins entscheidend beeinflusst, dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor. Schon zu Beginn des ersten Trimenons können VEGF-A und sein verwandter Rezeptor VEGFR-1/ Flt-1 in der Trophoblastenzellschicht der Blastozyste deutlich nachgewiesen werden. Während im ersten Trimester die Expression des Wachstumsfaktors auf Zellen des Amnion, Chorion und fötalen Makrophagen, sowie auf Deciduazellen und maternalen Makrophagen detektiert werden konnte, so wurde die Expression im zweiten Trimester im Amnion, Chorion und den Zellen der äußersten Plazentaschicht, den Synzytiotrophoblasten nachgewiesen. Im letzten Trimester zeigen neben Amnion, Chorion und Synzytiotrophoblasten auch Hofbauerzellen und Deziduazellen starke Signale der VEGF-A Expression (Ahmed et al. 1995, Demir et al. 2004, Cooper et al. 1995). Auch die Rezeptoren von VEGF-A, VEGFR-1/ Flt-1 und VEGFR-2/ KDR, werden über die gesamte Schwangerschaft hinweg in graviditäts-assoziiertem Gewebe exprimiert. Im ersten Trimester konnten Signale beider Rezeptoren im fötalen und maternalen vaskulären Endothel, sowie in extravillösen Trophoblasten und der Decidua nachgewiesen werden, wobei der VEGFR-1 ebenfalls in Hofbauerzellen und in maternalen Makrophagen gefunden wurde. Im letzten Trimester wird der VEGFR-1 von Synzytiotrophoblasten exprimiert (Ahmed et al. 1995, Demir et al. 2004, Sugino et al. 2002, Cooper et al. 1995, Clark et al. 1996). Die kontinuierliche Expression des Wachstumsfaktors und seinen verwandten Rezeptoren im fötalen und maternalen Bereich der Plazenta während der Schwangerschaft reflektiert die Bedeutung dieses Zytokins bei der Bildung erster Gefäße und der weiterführenden Vaskularisierung in der plazentaren Entwicklung (Demir et al. 2004, Clark et al. 1996).

Eine Hypothese für die spezifische Funktion der löslichen, nicht signaltransduzierenden Variante des VEGFR-1 (soluble VEGFR-1) besteht darin, dass dieser Rezeptor durch Bindung von VEGF-A dessen Bioverfügbarkeit reguliert und so eine Art Feinjustierung der Vaskularisierung vornehmen kann. Im Rahmen dieser Funktion könnte der sVEGFR-1 ebenso zur Erhaltung des uteroplazentaren Kreislaufs beitragen, indem er das Verschließen von Gefäßen innerhalb der Plazenta durch VEGF-A verbundene gefäßerhaltende Maßnahmen verhindert, und so das Öffnen der primären maternalen Gefäße im Uterus erst ermöglicht (pers. Kommunikation, Prof. Dr. Jörg Wilting).

2.2. Die pathologische Schwangerschaft

Viele exogene und endogene Einflüsse können die Entwicklung des Embryos oder des Fetus beeinträchtigen. Zu pathologischen Veränderungen in der Schwangerschaft zählen zum Beispiel der Gestationsdiabetes als Folge der unzureichenden Insulinproduktion der Mutter, sowie die intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR – intrauterine growth retardation) und der Abort, die beide vielfältige Ursachen haben können, wie die Einnahme bestimmter Medikamente oder Genussgifte, immunologische Veränderungen oder Anomalien des Uterus (Goerke et al. 2002). Ein weiteres Krankheitsbild in der Schwangerschaft ist die Präeklampsie, auf die im nächsten Kapitel näher eingegangen werden soll.

3. Präeklampsie

Präeklampsie ist eine hypertensive Erkrankung in der Schwangerschaft, die circa 5% aller Schwangerschaften weltweit betrifft (Heyn et al. 2006, Maynard et al. 2003, Venkatesha et al. 2006). Sowohl für die Mutter als auch für das Kind stellt sie ein deutliches Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko dar. Kennzeichnend für diese Erkrankung ist das parallele Auftreten von Bluthochdruck und Proteinurie (Sibai et al. 2005). Da diese Symptome nach Beendigung der Schwangerschaft innerhalb von 24h abklingen, wird Präeklampsie als plazenta-abhängige Krankheit angesehen, die sowohl mit lokalen intrauterinen als auch mit systemischen Symptomen einhergeht. Die Symptomatik ist sehr heterogen. So wird von einem moderaten Verlauf gesprochen, wenn bei der Mutter im Abstand von vier Stunden ein Blutdruck von $\geq 140/ \geq 90$ mmHg (Systole vs Diastole), und eine Proteinausscheidung im Urin von ≥ 300 mg/24h gemessen wird. Im schweren Verlauf steigt der Blutdruck auf $\geq 160/ \geq 110$ mmHg und die Proteinausscheidung auf ≥ 5 g/24h an. Ab der 20. Schwangerschaftswoche können weitere Symptome folgen, wie schwere Schädigungen der Leber und der Niere mit nachfolgender Oligourie (≤ 500 mL/24h) und schwerer Proteinurie, sowie pulmonale und zerebrale Ödeme oder Störungen der Gerinnung (Koagulopathie, Thrombozytopenie). Charakteristisch für den schweren Verlauf ist ebenfalls das gleichzeitige Auftreten mehrerer Symptome ab der 32. bis 34. Schwangerschaftswoche, auch als HELLP-Syndrom bezeichnet (Hämolyse, erhöhte Leberenzyme, niedrige Thrombozytenanzahl). Alle diese Symptome können vor (Prä-) dem Krampf (Eklampsie) beobachtet werden.

Überwiegend in den letzten Wochen vor der Geburt kann es dann zu plötzlichen Epilepsie-ähnlichen Krampfanfällen kommen (Eklampsie), infolgedessen Bewusstlosigkeit, Atemstillstand und krampfartige Kontraktion des Kehlkopfes auftreten (Matthiesen et al. 2005, Heyn et al. 2006). Die Auswirkungen auf das Ungeborene können eine

Mangelversorgung des Feten, intrauterine Wachstumsretardierung, sowie den intrauterinen Fruchttod umfassen. Die Zahl der tot geborenen oder in den ersten sieben Lebenstagen verstorbenen Kinder liegt bei Präeklampsie um das Fünffache höher verglichen mit einer gesunden Schwangerschaft (Heyn et al. 2006). Da die Ursachen der Erkrankung noch weitgehend unbekannt sind, gibt es keine kausale Therapie der Präeklampsie. Der Zustand der Mutter kann durch die Behandlung einzelner Symptome stabilisiert werden, beispielsweise durch blutdrucksenkende Medikamente (Maynard et al. 2003). Eine frühzeitige Beendigung der Schwangerschaft ist im schweren Verlauf jedoch häufig die einzige Möglichkeit, massive Schäden von Mutter und Kind abzuwenden (Stillman et al. 2007, Heyn et al. 2006). Nach Dekaden intensiver Forschung konnten Risikofaktoren ermittelt, und mögliche Thesen der Ursache dieser Erkrankung aufgestellt werden. So scheinen Vitamin-D Mangel, Adipositas, bereits bestehender Diabetes Mellitus, chronischer Bluthochdruck oder Mehrlingsschwangerschaften das Risiko für Präeklampsie zu erhöhen, und Parodontalerkrankungen die Schwere der Erkrankung negativ zu beeinflussen (Bodnar et al. 2007, Baumwell et al. 2007, Catov et al. 2007, Canakci et al. 2007). Als mögliche Ursachen werden neben genetischer Disposition, inflammatorischen Prozessen oder oxidativem Stress, Defekte in der Interaktion zwischen dem mütterlichen Immunsystem und dem des Kindes, Autoimmunerkrankungen, sowie eine Störung des Renin- Angiotensin- Systems angenommen (van Dijk et al. 2005, Matsubara et al. 2005, Dechend et al. 2005, Shah et al. 2007).

Eine weitere Theorie der Ätiologie dieser Erkrankung und Grundlage der vorliegenden Arbeit ist eine Störung des angiogenen Systems und der daraus resultierenden endothelialen Dysfunktion. Basierend auf diesem Hintergrund verläuft das lokale uterine Krankheitsbild in zwei Stufen: Die erste Stufe bilden die pathologischen Veränderungen der Plazenta, die zweite Stufe kennzeichnet das Auftreten klinischer Manifestationen der Präeklampsie im mütterlichen Organismus (Roberts et al. 2005).

3.1 Präeklampsie als Hypothese der endothelialen Dysfunktion

Die pathologischen Veränderungen der Plazenta begründen sich vor allem auf das Verhalten der Trophoblasten, Zellen die entscheidend an der Entwicklung, dem Aufbau und der Funktion der Plazenta beteiligt sind (Zhou et al. 1997a). Bei gesunder Gestation durchläuft ein Teil dieser Zellen im Laufe der Schwangerschaft Pseudovaskulogenese, um dann als endothel-ähnliche Zellen in die Spiralarterien zu migrieren und so deren Lumen und damit den einströmenden Blutfluss zu erweitern. Im Fall der Präeklampsie wurde beobachtet, dass Trophoblasten nicht in dieser Weise agieren (Zhou et al. 1997b). Die Folge ist eine

Mangelperfusion der Plazenta, in der sich daraufhin ein hypoxischer Zustand einstellt. Die Plazenta, speziell deren begrenzende Synzytiotrophoblasten, reagieren mit der Sekretion verschiedener Hypoxie-regulierter Moleküle, unter anderem dem massiven Ausstoß der löslichen fms-ähnlichen Tyrosinkinase (sVEGFR-1/ sFlt-1). Dieses Molekül agiert als Inhibitor, da es in der Zirkulation der Mutter hauptsächlich zwei proangiogene Schlüsselmoleküle bindet ohne einen Signalweg zu induzieren: den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor VEGF (VEGF-A) und den plazentalen Wachstumsfaktor (PlGF). In hohen Konzentrationen bewirkt dieser Inhibitor eine Verschiebung der angiogenen Balance, die sich im Fall der Präeklampsie als erstes in Schädigungen stark VEGF-regulierter Organe äußert, wie Niere oder Leber, die VEGF zur Erhaltung des fenestrierten Endothels und damit zur Erhaltung der eigentlichen Organfunktion benötigen. Wird durch den endokrin agierenden Inhibitor schließlich ein kritischer Schwellenwert der VEGF/ PlGF-Konzentration in der Zirkulation unterschritten, kommt es im weiteren Verlauf zu einer systemischen Dysfunktion des Endothels. Die Folge ist ein Multiorganversagen, das bereits ausführlich beschrieben wurde.

3.2 Schwangerschaftsbedingte Veränderungen im sVEGFR-1/ sFlt-1, VEGF-A und PlGF Spiegel

In der gesunden Schwangerschaft nimmt die Konzentration des zirkulierenden maternalen sFlt1 gegen Ende des letzten Trimesters von circa 1ng/mL auf 2ng/mL leicht zu. Präeklampsische Frauen zeigen dagegen einen starken Anstieg dieses Proteins im Plasma, dessen Konzentration sich proportional zur Schwere der Gestose verhält (Koga et al. 2003, Zhou et al. 2002, Tsatsaris et al. 2003, Staff et al. 2005). Levine et al. konnten demonstrieren, dass bei Präeklampsie die Zunahme des sVEGFR-1/ sFlt-1 fünf Wochen vor dem Auftreten der klinischen Symptome beginnt und bis auf 4ng/ml (vs 2ng/mL) steigt (Levine et al. 2004). Maynard et al. beobachteten eine Erhöhung der Konzentration in schwerer Präeklampsie auf bis zu 8ng/mL vs 1,8ng/mL (Maynard et al. 2003). Verschiedene Tiermodelle belegten, dass die Überexpression des sFlt-1 und damit die Inhibierung des verwandten Liganden VEGF-A zu einem klinischen Erscheinungsbild ähnlich dem der Präeklampsie führen (Li et al. 2007, Sugimoto et al. 2003, Levine et al. 2004, Maynard et al. 2003). So zeigte Maynard et al. am Rattenmodell, dass sowohl trächtige als auch nicht trächtige Ratten Präeklampsie- ähnliche Symptome aufweisen, wobei neben dem Blutdruck vor allem die Proteinkonzentration in nicht trächtigen Ratten stark erhöht war (Maynard et al. 2003). Eine kürzlich publizierte Arbeit demonstrierte am Primatenmodell das Auftreten präeklampsischer Symptome nach

chirurgisch induzierter Minderperfusion der Plazenta, verbunden mit einem starken Anstieg des Hypoxie-regulierten sFlt-1 in der Zirkulation. (Makris et al. 2007).

VEGF-A und PlGF verhalten sich während der Schwangerschaft unterschiedlich. Während die Konzentration des VEGF-A im Blut über die Schwangerschaft hinweg niedrig bleibt, nimmt PlGF im zweiten Trimester zu, erreicht einen Schwellenwert und fällt dann in den letzten zwei Schwangerschaftsmonaten, korrespondierend zum Anstieg des sVEGFR-1/ sFlt-1, wieder ab. Da die Konzentrationen von sVEGFR-1/ sFlt-1 zu Beginn der Schwangerschaft recht niedrig sind nehmen Levine et al. einen proangiogenen Zustand während der ersten zwei Trimester an. Durch den Anstieg des sVEGFR-1/ sFlt-1 und den Abfall von VEGF-A und PlGF im letzten Trimester wird das Wachstum der Plazenta durch den dann vorliegenden antiangiogenen Zustand verlangsamt (Levine et al. 2004). In der Präeklampsie steigt die Konzentration des sVEGFR-1/ sFlt-1 zeitiger und stärker. PlGF zeigt einen ähnlichen Verlauf wie in gesunder Schwangerschaft, die Konzentrationen liegen jedoch deutlich niedriger. VEGF-A verhält sich unverändert, nur gegen Ende der Schwangerschaft konnte ein leichter Abfall beobachtet werden (Levine et al. 2004).

Kürzlich konnte eindrucksvoll demonstriert werden, dass lösliches Endoglin (sEng), ein TGF- β Co-Rezeptor, sich ähnlich bei Präeklampsie verhält wie sVEGFR-1/ sFlt-1. So wurde gezeigt, dass dieses Protein im Serum präeklampsischer Frauen ebenfalls stark erhöht ist, die Konzentration mit der Schwere der Krankheit korreliert, und der Spiegel des Proteins nach der Niederkunft stark zurückgeht. Bei Experimenten mit trächtigen Ratten wurde nach paralleler adenoviraler Überexpression beider Proteine ein synergistischer Effekt beobachtet, dessen Folgen den Symptomen einer schweren Präeklampsie glichen, wie HELLP-Syndrom oder verminderter intrauteriner Wuchs (Venkatesha et al. 2006).

4. Das VEGF-Rezeptorsystem

Strukturell gehört die Familie der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF-vascular endothelial growth factor) der VEGF-PDGF (platelet derived growth factor) Super-Familie an. Die Familie des VEGF umfasst sieben sekretierte Glykoproteine; VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, und PlGF (plazentarer Wachstumsfaktor), sowie das aus Orf-Viren stammende VEGF-E und das erst kürzlich aus Schlangen-Venom isolierte svVEGF (snake venom, aus *Bothrop insularis*), und *Tf svVEGF* (*Trimeresurus flavoviridis* svVEGF; Vammin), zusammengefasst unter VEGF-F. Diese Faktoren transduzieren Signale durch Bindung an die morphologisch verwandten Rezeptoren VEGFR-1 (Flt-1, fms-like tyrosine kinase 1), VEGFR-2 (KDR, kinase insert domain receptor / Flk-1, fetal liver kinase 1), VEGFR-3 (Flt-4, fms-like tyrosine kinase 4) und die Co-Rezeptoren Neuropillin-1 (Nrp-1) und Neuropillin-2 (Nrp-2) (Suto et al. 2005, Tammela et al. 2005).

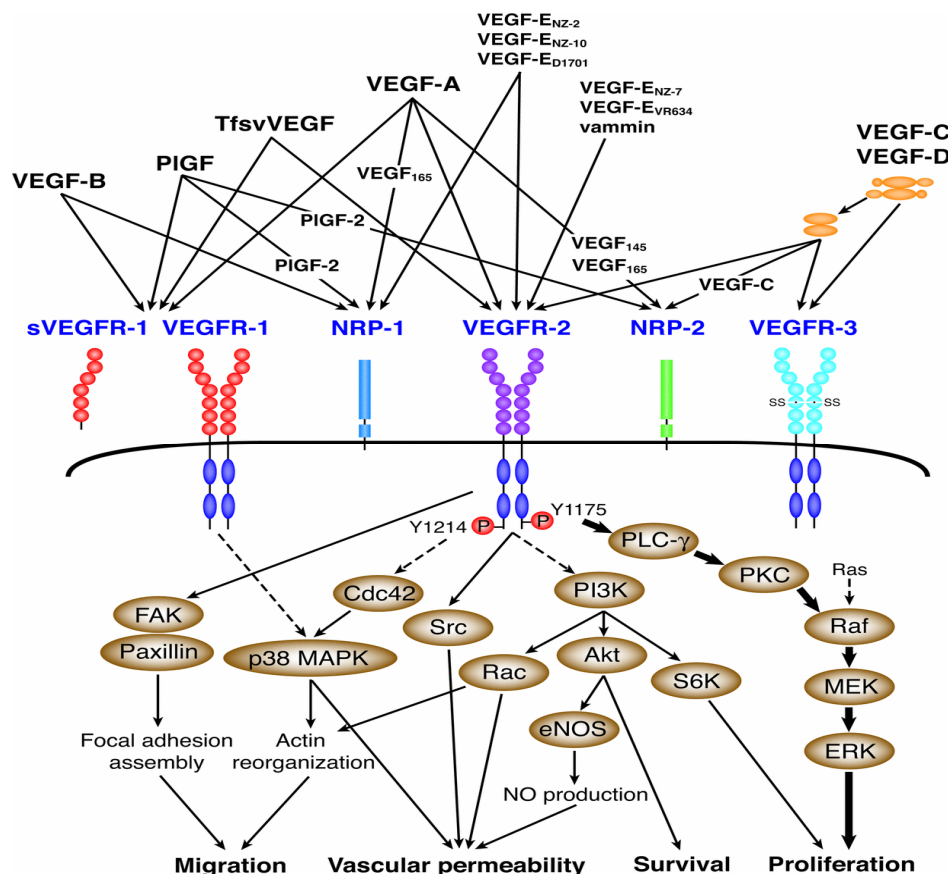


Abb. I.2: Die VEGF-Familie und ihre Rezeptoren. Die von VEGFR-2 und VEGFR-1 bekannten Signalwege sind skizziert. FAK- fokale Adhäsionskinase, Cdc42- Cdc42 Kinase, p38MAPK- p38 Mitogen aktivierte Proteinkinase, Src- Src Proteinkinase, PI3K- Phospho-inositol-3 Kinase, Akt- Akt-Kinase, eNOS- endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase, S6K – S6 Proteinkinase, PLC-γ – Phospholipase S-γ, PKC –Proteinkinase C, Raf – rapidly growing Fibrosarcoma protein, MEK – mitogen aktivierte extrazellulär regulierte Proteinkinase, ERK – extrazellulär regulierte Kinase (nach Takahashi 2005)

Die Genprodukte der Liganden zeichnen sich durch acht Cysteinreste aus, die an der gleichen Stelle konserviert sind und als Dimere auftreten. Dabei sind zwei von acht Cysteinresten intermolekular, und die restlichen sechs Cysteinreste intramolekular über Disulfidbrücken miteinander verbunden und formen so ein Dimer, dessen Monomere antiparallel zueinander gelagert sind (Shibuya et al. 2001).

4.1 Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor A

VEGF-A ist ein endothelspezifischer Wachstumsfaktor und das am besten charakterisierte Mitglied der VEGF-Familie. Seit seiner Entdeckung, zeitgleich als vaskulärer Permeabilitätsfaktor und als vaskulärer zellspezifischer Wachstumsfaktor, hat sich VEGF als einer der wichtigsten Regulatoren der Blutgefäßbildung sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen etabliert (Kroll et al. 2000, Otrock et al. 2007, Senger et al. 1983, Leung et al. 1989).

Das homodimere Glykoprotein bindet VEGFR-1 und VEGFR-2. Durch alternatives Exon-Spleißen des humanen Gens entstehen sechs Transkripte die die Exone 1-5 (N-terminal) und 8 (C-terminal) enthalten, und deren Diversität durch das abweichende Spleißen der Exone 6 und 7 bestimmt wird. Die so entstandenen Isoformen werden nach Anzahl der Aminosäuren unterschieden: VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₃, VEGF-A₁₈₉, VEGF-A₂₀₆, und weisen eine molekulare Masse von 18 bis 24 kDa auf (Ferrara et al. 1989, Gospodarowicz et al. 1989, Connolly et al. 1989). Eine weitere Spliceform, VEGF-A_{165b}, wurde als endogener Inhibitor der Angiogenese identifiziert (Bates et al. 2002). In murinen Organismen existieren ähnliche Spleißmechanismen, deren Produkte jedoch eine Aminosäure kürzer sind. VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₆₅ und VEGF-A₁₈₉ werden am stärksten und von den meisten Zelltypen exprimiert. VEGF-A₁₆₅ unterscheidet sich zusätzlich von den anderen Isoformen durch einen 44 Aminosäuren langen Terminus, der die Bindung an den Oberflächen-Co-Rezeptor NRP-1 (Neuropilin-1) ermöglicht. Es konnte gezeigt werden, dass die Assoziation des VEGF-A₁₆₅ mit NRP-1 zusätzlich zur Bindung des VEGF-Rezeptors 2/ KDR zu einer 10-fachen Verstärkung der Affinität zwischen VEGF-A₁₆₅ und VEGFR-2/ KDR führt. Das macht die Isoform VEGF-A₁₆₅ zum stärksten Signaltransduktor der VEGF-Familie (Tammela et al. 2005, Kroll et al. 2000, Shibuya et al. 2001).

Knock-out Experimente mit VEGF-A zeigten, dass dieser Wachstumsfaktor für die Entwicklung der Blutgefäße essentiell ist. Bereits der Verlust eines Allels führt zur Letalität der Mäuseembryonen am Tag 10,5 der Embryonalentwicklung. Der Phänotyp VEGF-A-defizienter Tiere ist durch eine abnormale Endothelentwicklung, verbunden mit einer starken

Beeinträchtigung der Ausbildung der Endothelzellen, charakterisiert. Unterschiedliche biologische Funktionen der VEGF-A Isoformen konnten durch Experimente mit isoformspezifischen knock-out Mäusen belegt werden. So wurde beobachtet, dass Mäuse, die allein VEGF₁₂₁ exprimierten, kurz nach der Geburt starben oder ischämische Myokardiopathie und multiples Organversagen zeigten. Mäuse, die ausschließlich das Gen für VEGF₁₈₈ trugen, starben ebenfalls bei der Geburt oder wiesen eine verminderte Entwicklung der Arteriolen auf. Im Gegensatz dazu waren Mäuse, die allein VEGF₁₆₄ exprimierten, lebendig und gesund (Kroll et al. 2000, Holmes et al. 2005). Die besondere Bedeutung des VEGF für die Niere konnte durch einen Podozyten-spezifischen knock-out demonstriert werden. Die Tiere starben perinatal aufgrund einer fehlerhaften Entwicklung der glomerulären Filtrationsbarriere hervorgerufen durch Störungen der endothelialen Zellmigration und Zelldifferenzierung (Eremina 2003).

VEGF-A wird von einer Vielzahl von adultem und fötalem Gewebe exprimiert (Houck et al. 1991). In Föten der Schwangerschaftswochen 16 – 22 konnte eine starke VEGF-A Expression in Lunge, Niere und Milz nachgewiesen werden; moderate Signale wurden im Herzen, der Nebenniere, dem Pankreas, dem Darm, der Leber, dem Hoden, der Haut, dem Muskel und dem Hirn beobachtet (Shifren et al. 1994). Im adulten Gewebe konnte die physiologische VEGF Expression unter anderem in Makrophagen, glatten Muskelzellen, Osteoblasten, Keratinozyten und Geweben wie Epidermis, Lunge und Hypophyse nachgewiesen werden. Bei vielen Tumorzellen und Tumorgeweben konnte ebenfalls eine VEGF Expression belegt werden, die eine wichtige Rolle bei der Angiogenese und Metastasierung von Tumorgeweben spielt (Berse et al. 1992, Ferrara et al. 1991, Harada et al. 1995, Freeman et al. 1995, Brown et al. 1992, Viac et al. 1997, Ferrara et al. 1989, Senger et al. 1993).

Die Bedeutung von VEGF-A spiegelt sich in dessen Beteiligung an zahlreichen Regulationsmechanismen des Körpers wieder. Neben der Schlüsselfunktion in Vaskulo- und Angiogenese übernimmt VEGF-A sowohl Aufgaben bei der Regulation der Permeabilität der Gefäße, insbesondere dem fenestrierten Endothel, als auch bei der Blutdruckregulation *via* der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (Kroll et al. 2000).

4.2 Weitere Liganden der VEGF-Familie

PlGF (der plazentare Wachstumsfaktor) und VEGF-B binden ebenfalls den VEGFR-1, zeigen jedoch bei weitem nicht die starken Signale, die bei der Signaltransduktion, ausgelöst durch VEGF-A, beobachtet wurden. Die genaue Funktion beider Zytokine konnte noch nicht

definiert werden. *In-vivo* zeigten Versuche mit PlGF knock-out Mäusen eine verminderte Ausbildung von Kollateralgefäßen als Antwort auf die experimentell herbeigeführte Ischämie im Hinterbein, was auf einen proangiogenen Einfluß schließen lässt (Park et al. 1994, Carmeliet et al. 2001). Verminderte angiogene Reaktionen im Kollagen-induzierten Arthritis-Modell von VEGF-B defizienten Mäusen ließen Mould *et.al.* auf eine mögliche Rolle des VEGF-B bei inflammatorischer Angiogenese schließen (Mould et al. 2003).

VEGF-C und VEGF-D binden beide spezifisch den VEGFR-3 und mit geringerer Affinität ebenfalls den VEGFR-2. Knock-out Mäuse für VEGF-C entwickelten kein Lymphsystem und starben an E15.5 – E17.5 aufgrund von Gewebsödemen, während sich das Fehlen eines VEGF-C-Allels im Auftreten von Lymphödemen, verbunden mit einer Hypoplasie der Lymphgefäße in der Haut äußerte (Karkkainen et al. 2004). Eine VEGF-D abhängige Stimulation der Angiogenese und Lymphangiogenese konnte in der Muskulatur des Hinterbeins von Kaninchen nachgewiesen werden und in verschiedenen experimentell generierten kanzerogenen Geweben wie Lungen- und Brusttumoren, wobei VEGF-D überwiegend lymphatisch gerichtete Prozesse forcierte. Diese Experimente weisen VEGF-C und VEGF-D eine weitreichende Bedeutung in der Lymphangiogenese zu (Rissanen et al. 2003). VEGF-E und VEGF-F wurden nicht aus dem menschlichen Genom isoliert. Während VEGF-E Isoformen aus unterschiedlichen Stämmen des Parapoxvirus *Orf* isoliert wurden und den VEGFR-2 hochaffin binden, konnten weitere VEGF-relevante Proteine aus unterschiedlichen Schlangen isoliert werden. Diese zur Gruppe der VEGF-F zusammengefassten Proteine binden teils den VEGFR-1, teils den VEGFR-2 hochaffin. Laut Takahashi *et.al.* weisen diese unterschiedlichen Bindungsaktivitäten auf individuell biologische Charakteristika und damit auf eine gewisse Abweichung in der Klassifikation der Wirtsschlange (Takahashi et al. 2005, Suto et al. 2005). Alle diese Gene der VEGF-Familie enthalten kein hypoxisch responsives Element (HRE), sind also nicht durch Hypoxie reguliert, im Gegensatz zu VEGF-A (Tuder et al. 1995).

4.3. Die Rezeptoren der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren

Alle Rezeptoren der VEGF-Familie gehören zur Gruppe der Rezeptor-Tyrosinkinasen, die sich unter anderem durch einen dreiteiligen Bau auszeichnen. Extrazellulär befinden sich die Bindedomänen der Liganden. Diese werden von einer transmembranen Domäne abgelöst, die der Verankerung des Rezeptors auf der Zelloberfläche dient. Intrazellulär folgen die Tyrosinkinase-Domänen, die Phosphorylierungsstellen zur Signalweiterleitung enthalten. Bindet ein Liganden-Dimer an die extrazelluläre Region einer Rezeptor-Tyrosinkinase, so

dimerisieren zwei Rezeptormonomere. Infolgedessen kommt es zu einer Konformationsänderung an den Rezeptoren und damit zu einer Überkreuz-Aktivierung der Tyrosinkinasen. Die Bindung von ATP bewirkt, dass der flexible carboxyterminale Teil des Rezeptors die Substratbindestelle der Tyrosinkinase erreicht und daraufhin an bestimmten Autophosphorylierungsstellen phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierung kann auch durch die Tyrosinkinase des zweiten Rezeptormonomers erfolgen, durch *Trans*- oder *Cross*phosphorylierung. Abhängig von der Phosphorylierungsstelle können verschiedene Signalwege aktiviert werden. Die nun phosphorylierten Tyrosinreste ermöglichen die Bindung intrazellulärer SH2-Domänen-tragender Signalproteine und damit die Weiterleitung der durch Ligandenbindung initiierten Signalkaskade (Veikkola et al. 2000).

4.3.1 Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor Rezeptor 1 (VEGFR-1/ Flt-1)

Der VEGFR-1 wurde 1990 erstmalig durch Shibuya et al. beschrieben und aufgrund seiner hohen Ähnlichkeit zur fms-Proteinfamilie (fms: macrophage colony stimulating factor; Flt-1: fms-like tyrosine kinase) benannt (Shibuya et al. 2001). Dieses Rezeptorprotein zeigt prinzipiell den gleichen Bau wie VEGFR-2, ist jedoch mit 180 kDa etwas kleiner. Im Gegensatz zum VEGFR-2 befindet sich die Ligandenbindestelle an der zweiten homologen Immunglobulindomäne, und der Rezeptor bindet neben VEGF-A und *T.f.* svVEGF spezifisch VEGF-B und PlGF (Shibuya et al. 2006, deVries et al. 1992, Olofsson et al. 1998, Clauss et al. 1996).

Der Rezeptor wird überwiegend von Zellen des vaskulären Endothels exprimiert, seine Expression wurde jedoch auch schon in verschiedenen anderen Zelltypen nachgewiesen, wie in Osteoblasten, Monozyten/Makrophagen, Perizyten, plazentalen Trophoblasten sowie renalen mesangialen Zellen und einigen hematopoetischen Stammzellen (Ferrara et al. 2003, Sawano et al. 2001, Ahmed et al. 1995, Helske et al. 2001, Thomas et al. 2000, Takahashi et al. 1995, Rafii et al. 2002). Kürzlich konnte die Expression in vaskulären adventitialen Fibroblasten gezeigt werden (Jin et al. 2007). Während der Entwicklung wird der Rezeptor als erstes in Angioblasten exprimiert und dann im Endothel, später nimmt die Expression ab. Im adulten Organismus ist der VEGFR-1 in proliferierenden Zellen hochreguliert, also bei Entzündung, Wundheilung oder Regeneration, als auch bei karzinogenem Wuchs, sowie unter hypoxischen Bedingungen, im Gegensatz zu VEGFR-2 und VEGFR-3, die nicht durch Hypoxie stimuliert werden (Gerber et al. 1997, Partanen et al. 1999).

Die Affinität des Rezeptors zu VEGF-A ist sehr hoch. Mit einem K_D von 2 – 10 pM liegt sie um das Zehn- bis Hundertfache höher verglichen mit der Affinität des VEGFR-2. Im

Gegensatz dazu zeigt der VEGFR-1 jedoch nur eine schwache Aktivität der Tyrosinkinase (Shibuya et al. 2006). Trotzdem VEGFR-1 aufgrund dieser verminderten Tyrosinkinaseaktivität nur schwach mitogene Signale in Endothelzellen transmittiert, konnte durch die Bildung eines Heterodimers mit VEGFR-2 ein vielfach stärkeres Signal induziert werden als durch Homodimerbildung des VEGFR-1 oder VEGFR-2 (Huang et al. 2001).

In 2003 zeigte die Gruppe um LeCouter, dass die Aktivierung des VEGFR-1 in Endothelzellen des Lebersinusoids umgebende Hepatozyten zur Proliferation anregte. Ein durch Hepatotoxin hervorgerufener Leberschaden wurde so reduziert. LeCouter schloss daraus, dass VEGFR-1 therapeutisches Potenzial zur Erhaltung der Organfunktion hat (LeCouter et al. 2003). Des Weiteren konnte eine Rolle des VEGFR-1 auf verschiedenen Gebieten nachgewiesen werden, so zum Beispiel bei Arteriosklerose (Murakami et al. 2005), bei Entzündung (Sawano et al. 2001), bei der Entstehung von Tumoren (Birnbaum et al. 1995, Volm et al. 1997), rheumatoider Arthritis (Murakami et al. 2006), sowie bei der Rekonstitution des Knochenmarks (Raffi et al. 2002). Auf eine weitere Funktion lassen Experimente des VEGFR-1 mit dem VEGFR-2 spezifischen Liganden svVEGF schließen. Das von Takahashi et al. isolierte T.f. svVEGF aktivierte den VEGFR-1 zehnfach stärker im Vergleich zu VEGFR-2. Die Experimente zeigten einen starken Effekt auf die vaskuläre Permeabilität. Diese Beobachtung wurde auf die Aktivierung beider Rezeptoren zurückgeführt, die durch Ausbildung von Heterodimeren einen synergistischen Effekt erzielten (Takahashi et al. 2004).

Heterozygote knock-out Mäuse für den VEGFR-1 zeigten nach experimenteller Ischämie mit nachfolgender Reperusionsperiode eine verschlechterte Rekonvaleszenz des Myokards, im Vergleich zum Wildtyp (Addya et al. 2005, Thirunavukkarasu et al. 2007). Dagegen waren Mäuse, homozygot für die gezielte Mutation des VEGFR-1 Gens, nicht lebensfähig und starben in der Embryonalentwicklung zwischen E8.5 und E9.0. Dieser Phänotyp äußerte sich durch diffuses Überwachsen endothelialer Zellen sowie eine gestörte Organisation der entstehenden Blutgefäße (Fong et al. 1995). Das Ergebnis legt nahe, dass der VEGFR-1 im Embryo eine negative Rolle hinsichtlich der Angiogenese spielt, indem pro-angiogene Signale unterdrückt werden. So kann eine kritische Balance erhalten werden, die notwendig für die physiologische Gefäßbildung ist (Shibuya et al. 2006). Eine weitere Untersuchung befasste sich mit murinen Mutanten, denen die intrazelluläre Domäne des Rezeptors, also die Tyrosinkinaseaktivität fehlte. Neben kleineren Defekten bei der Blutgefäßbildung konnte eine gestörte Migration von Makrophagen zu VEGF-A Stimuli beobachtet werden (Hiratsuka et al. 1998). Diese Ergebnisse zeigen, dass der suppressive Effekt auf die Angiogenese mit großer

Wahrscheinlichkeit allein auf die extrazelluläre und transmembrane Domäne des Rezeptors zurückzuführen ist. Die intrazelluläre Kinaseaktivität hat dabei keinen Einfluß auf die Bindung von VEGF-A und ebenfalls nicht auf die Regulation der lokalen Verfügbarkeit des Liganden nahe der Oberfläche endothelialer Zellen (Shibuya et al. 2006). Aufgrund der hohen Affinität des Rezeptors zu VEGF-A und der vergleichsweise überraschend niedrigen Phosphorylierung, die bislang nur nachgewiesen werden konnte, vermuteten Hornig und Weich bereits vor einigen Jahren, dass Flt-1 Aufgaben als reiner Regulator der Bioverfügbarkeit des Schlüsselmoleküls VEGF-A übernimmt, und in der aktiven Signaltransduktion eher eine untergeordnete Rolle spielt (Hornig et al. 1999).

4.3.2 Der lösliche vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor Rezeptor 1 (sVEGFR-1/ sFlt-1)

Kendall et al. entdeckten 1993, dass neben der membrangebundenen Form des VEGFR-1 noch eine weitere, lösliche Variante existiert, die durch das gleiche Gen codiert, jedoch über differentielles Spleißen generiert wird (Kendall et al. 1993). Diese lösliche Form (sVEGFR-1 = soluble VEGFR-1) setzt sich allein aus den sechs homologen Immunglobulindomänen des extrazellulären Bereichs verbunden mit einer 31 Aminosäuren langen C-terminalen phylogenetisch konservierten Region zusammen, und bindet VEGF-A, VEGF-B und PlGF mit der gleichen hohen Affinität wie der transmembrane Rezeptor. Aufgrund der fehlenden Verankerung in der Membran agiert diese Form systemisch, also endokrin. Da mit dem intrazellulären Bereich auch die Tyrosinkinaseaktivität fehlt, wird bei der Bindung des Liganden kein Signalweg aktiviert. Folglich reduziert die Bindung des Liganden durch diese lösliche Rezeptorvariante die Bioverfügbarkeit von VEGF-B, PlGF und insbesondere VEGF-A als einem der wichtigsten angiogenen Stimulatoren, und fungiert somit als negativer Regulator der Angiogenese (Kendall et al. 1993). Helske et al. wies nach, dass dieser lösliche Rezeptor ebenfalls von Trophoblasten der Plazenta sekretiert wird (Helske et al. 2001). Später wurde gezeigt, dass die Konzentration des sVEGFR-1 im Serum präeklampsischer Frauen stark erhöht ist (Koga et al. 2003, Maynard et al. 2003). Die negativ regulierende Funktion des sVEGFR-1 bezüglich VEGF-A konnte eindrucksvoll durch eine kürzlich erschienene Publikation demonstriert werden. Hier wurde gezeigt, dass die natürlich gegebene Avaskularität der Cornea des Auges durch sVEGFR-1 ermöglicht wird. Der Rezeptor bindet vollständig in der Cornea enthaltenes VEGF-A und verhindert so die Vaskularisierung, gibt also die Voraussetzung für eine glasklare Bindehaut (Ambati et al. 2006).

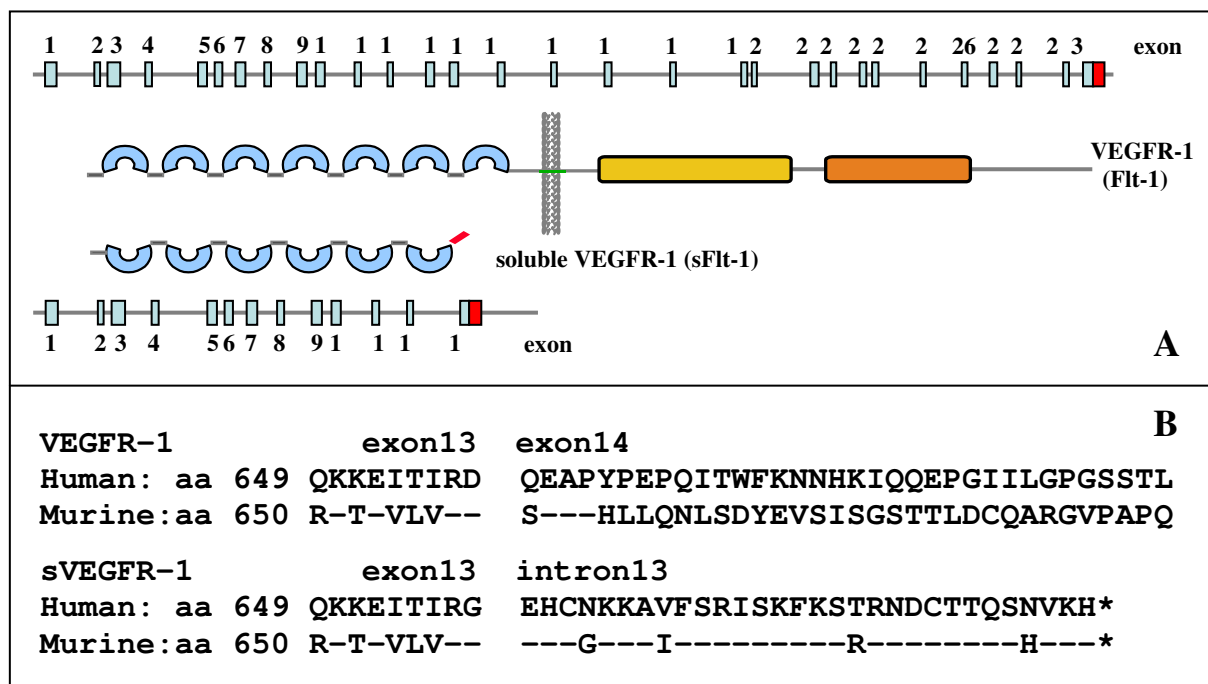


Abb. I.3: Die Genkarte des VEGFR-1.

A) Gezeigt ist das Gen des transmembranen VEGFR-1 und des löslichen, durch differentielles Spleißen aus dem gleichen Gen hervorgegangenen sVEGFR-1. Die transmembrane Variante zeigt extrazellulär 7 homologe Domänen, gefolgt von der transmembranen (tm) Domäne und der intrazellulär gelegenen geteilten Tyrosinkinase-Domäne. Die lösliche Variante besteht aus 6 homologen Domänen die identisch mit den extrazellulären Domänen 1-6 der transmembranen Variante sind.

B) Exon 13 ist für die lösliche und transmembrane Variante identisch. Die lösliche Form enthält zusätzlich eine gut konservierte Endsequenz von 31 Aminosäuren unbekannter Funktion, die durch Intron 13 codiert wird, und hohe Übereinstimmung mit der murinen Sequenz aufweist (Shibuya et al. 2001).

4.3.3 Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor Rezeptor 2 (VEGFR-2/ KDR/ Flk-1)

Der VEGFR-2 stellt einen der frühesten Marker in der Entwicklung endothelialer Zellen dar (Kabrun et al. 1997), und besteht aus sieben extrazellulären homologen Immunglobulin Domänen. Die zweite und dritte Domäne repräsentiert die Bindestelle der Liganden, während die vierte Domäne zur Dimerisierung zweier Rezeptormonomere erforderlich ist. Die intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne wird von einer ca. 70bp langen Kinase-Insert Region unterbrochen, und so in einen katalytischen und einen regulatorischen Bereich unterteilt. (Hornig et al. 1999, Shibuya et al. 2006). Erst kürzlich konnte durch Takahashi und seine Mitarbeiter gezeigt werden, dass genau ein Tyrosinrest, die Autophosphorylierungsstelle Y 1175, verantwortlich für die VEGF-A induzierte Signalweiterleitung via PLC- γ und MAP-Kinase hin zur DNA-Synthese ist (Takahashi et al. 2001). Der VEGFR-2 bindet sowohl VEGF-A, -E und svVEGF, als auch die prozessierten Formen des VEGF-C und -D. Es konnte gezeigt werden, dass VEGF-A, -C, und -D die Expression des Rezeptors induzieren, die Expression also autoreguliert ist (Stacker et al. 2001, Shima et al. 1995, Kremer et al.

1997). Die Affinität zu VEGF-A ist dabei weitaus höher im Vergleich zu VEGF-C und VEGF-D (Shibuya et al. 2006). Neben vaskulären Endothelzellen, sowohl Blut- als auch Lymphendothel, ist die Expression bei einer Vielzahl nicht endothelialer Zellen beobachtet worden, wie bei neuronalen Zellen, Osteoblasten, Zellen des pankreatischen Ductus, retinalen Vorläuferzellen oder Megakaryozyten (Goldman et al. 2006, Matsumoto et al. 2001). Die angiogene Bedeutung dieses Rezeptors konnte durch VEGFR-2 defiziente Mäuse demonstriert werden, die zwischen E8.5 und E9.5 *in utero* starben, aufgrund der fehlenden Entwicklung von Blutinseln im Dottersack, der Grundlage für die spätere Entwicklung von Blutgefäßen. (Shalaby et al. 1995). Ferner wurde eine VEGF-A vermittelte Stimulation der Lymphangiogenese *via* VEGFR-2 beobachtet, vermutlich durch Hochregulation des VEGF-C (Shibuya et al. 2006, Nagy et al. 2002). Mitogene Signale werden ebenfalls durch VEGF-C und VEGF-D *via* des VEGFR-2 übertragen (Saaristo et al. 2002, Veikkola et al. 2001), sowie durch die VEGFR-2 restriktiven Liganden VEGF-E und svVEGF (Shibuya et al. 2001, Suto et al. 2005, Otrrock et al. 2007). Die Existenz einer natürlich vorkommenden löslichen Variante des VEGFR-2 konnte kürzlich belegt werden: Ebos et al. isolierten ein 160kDa-großes Protein aus humanem und murinem Plasma. Sie konnten zeigen, dass es durch anti-VEGFR-2 gerichtete monoklonale und polyklonale Antikörper detektiert wird, an VEGF-A bindet und in konditioniertem Medium muriner und humaner endothelialer Zellen vorliegt. Folglich identifizierten sie es als natürlich vorkommende lösliche Variante des VEGFR-2 (Ebos et al. 2004). Wird der VEGFR-2 während der Embryonalentwicklung in vaskulären Vorläuferzellen stark exprimiert, so geht die Expression im adulten Organismus zurück. Nur unter pathologischen Bedingungen, wie in Tumoren, ist der VEGFR-2 hoch reguliert. Aufgrund von Experimenten an VEGFR-2 defizienten Mäusen, die eine entscheidende Rolle des Rezeptors in der Blutgefäßentwicklung belegten, und der starken angiogenen Signaltransduktion *via* VEGF-A, wird der VEGFR-2 als primärer Rezeptor der Angiogenese betrachtet (Ferrara et al. 2003).

4.3.4 Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor Rezeptor 3 (VEGFR-3/ Flt-4)

Der VEGFR-3 hat eine Masse von 195kDa und ist ein hoch-affiner Rezeptor für VEGF-C und VEGF-D (Joukov et al. 1996, Achen et al. 1998). Im Aufbau gleicht er grundsätzlich dem der Rezeptoren 1 und 2. Abweichend enthält er jedoch sechs homologe Immunglobulin-Domänen, wobei die fünfte nach Biosynthese proteolytisch abgespalten wird und lediglich über Disulfidbrücken mit der Polypeptidkette verbunden bleibt (Pajusola et al. 1993, Pajusola et al. 1994). Nach Prozessierung entstehen aus einem humanen Transkript zwei Isoformen,

5,8kb und 4,5kb, die sich C-terminal unterscheiden. In der Maus konnte bislang nur eine Form nachgewiesen werden (Hughes et al. 2001). Während der Entwicklung wird dieser Rezeptor stark von Blutendothelzellen exprimiert, im adulten Organismus hingegen ist die Expression dann auf lymphatische Endothelzellen in fenestrierten Kapillaren und Venen endokriner Organe, als auch auf Monozyten und Makrophagen beschränkt (Shibuya et al. 2006, Kaipainen et al. 1995). Unter pathologischen Bedingungen, wie in karzinogenem Gewebe, ist die Expression des VEGFR-3 ebenfalls hochreguliert (Valtola et al. 1999, Partanen et al. 1999). VEGFR-3 defiziente Mäuse starben am Tag 9.5 der Embryonalentwicklung durch Störungen bei der Bildung des primären vaskulären Plexus und der Hämatopoese (Dumont et al. 1998). Die transgene Überexpression des VEGFR-3 in muriner Haut hingegen hemmte die fetale Lymphangiogenese und führte zur Regression schon vorhandener lymphatischer Gefäße. Die Differenzierung endothelialer Zellen und die Bildung primitiver Blutgefäßnetzwerke sowie die vaskuläre Knospung verliefen jedoch normal (Mäkinen et al. 2001). Im Menschen äußern sich missense-Mutationen dieses Gens im Hereditären Lymphom, ähnliche Symptome konnten im Mausmodell des Lymphödems beobachtet werden (Karkkainen et al. 2000, Karkkainen et al. 2001). So scheint der Rezeptor eine generelle Funktion bei der Blutgefäßentstehung in der Entwicklung zu übernehmen, während sich seine Funktion später hauptsächlich auf das lymphatische System fokussiert.

5. Der physiologische Hintergrund des Tiermodells

Im Tiermodell sollte der Zustand der Präeklampsie als angiogene Dysfunktion simuliert werden. Als Organismus wurde dafür die Maus gewählt. Mäuse als Modellsystem zeigen den Vorteil, dass aufgrund ihrer Größe Menge und Volumen zu applizierender Substanzen gering ausfallen, verglichen mit Ratte oder Kaninchen. Ein weiterer Vorteil ist die hohe Anzahl zur Verfügung stehender mausspezifischer Analysewerkzeuge.

Im Gegensatz zur transgenen Maus, wo die Auswirkung einer Deletion (knock-out), oder das Hinzufügen (knock-in) eines Gens betrachtet wird, sollte hier der Effekt des Überschusses eines Proteins untersucht werden. Als Transfersystem wurde die adenovirale Überexpression gewählt, die bereits erfolgreich in Modellen zur systemischen Überexpression von Proteinen eingesetzt werden konnte (Compagni et al. 2000, Crnic et al. 2004, Roy et al. 2005).

Um den Zustand der Präeklampsie in der Maus zu simulieren, sollten die Symptome dieser Krankheit im Modell examiniert werden. Proteinurie, als Folge schwerer Nierenschädigung, sowie eine starke Erhöhung des Blutdrucks sind dabei Symptome die bei allen Formen der

Präeklampsie auftreten und somit als Schlüsselsymptome dieser Krankheit gelten. Sie wurden deshalb ausgewählt um das Mausmodell zu etablieren.

Basierend auf der Arbeitshypothese der endothelialen Dysfunktion sollte in der vorliegenden Arbeit unter anderem gezeigt werden, dass der Überschuss des angiogenen Inhibitors sVEGFR-1/ sFlt-1 allein in der Lage ist, präeklampsische Symptome wie Nierenschädigung, Proteinurie und Hypertension in der Maus experimentell hervorzurufen.

5.1 Das Symptom Nierenschädigung und Proteinurie

Die Niere erfüllt eine Vielzahl verschiedener Funktionen. Neben der Sekretion von Hormonen und der Regulation von Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt ist sie verantwortlich für die Exkretion von Abbaustoffen und Giften aus dem Körper. Das geschieht über die Ultrafiltration des Blutes. Diese findet in den Glomeruli, den Funktionseinheiten der Niere statt.

Die Glomeruli bestehen aus langen Kapillarschlingen die in sich verkäult sind, und in dieser Lage durch das Mesangiom fixiert werden. Sie sind von der Bowmann'schen Kapsel umgeben, die nach erfolgter Filtration des Blutes das Filtrat in Form von Primärharn auffängt und in den proximalen Tubulus weiterleitet. Während das Blut die Kapillarschlingen in den Glomeruli durchströmt, wird ein geringer Teil an Proteinen abgetrennt, sowie Wasser und gelöste Bestandteile herausfiltriert, die bei Bedarf später in der Niere partiell rückresorbiert werden. Die semipermeable Wandung dieser Kapillaren, die Schlitzmembran, besteht aus einem dreischichtigen Filter: einem nierenspezifischen fenestrierten (gefensterten) Endothel das die glomeruläre Kapillare auskleidet, gefolgt von einer stark negativ geladenen Basalmembran, die wiederum von einer Schicht viszerale Epithels, den Podozyten, umschlossen wird. Diese außerordentlich großen Zellen haben Fußfortsätze die direkt der Basalmembran aufliegen und so den dritten Teil der Schlitzmembran bilden. Im Gegensatz zu anderen Drüsen wie Pankreas oder Leber ist die Niere das einzige Organ dessen Fenestrierungen nicht von einem Diaphragma überzogen sind. Entscheidend für die Aufrechterhaltung dieser Sonderform des Endothels ist die Gegenwart einer definierten Konzentration an VEGF, die durch die Podozyten, also parakrin, bereit gestellt wird.

Nach adenoviraler Überexpression des sFlt-1 im Mausmodell gelangen große Mengen über die Zirkulation in die Niere, wo sie VEGF binden ohne Signale zu induzieren. Die Menge an bioaktivem VEGF in der Niere sowie in anderen Organen sinkt. Daraufhin kollabiert zuerst das glomeruläre fenestrierte Endothel, und Blutproteine, wie Albumin, gelangen in hohen Konzentrationen in den Urin. Die glomeruläre Filtrationsbarriere ist daraufhin stark

geschädigt und die Niere in ihrer Funktion beeinträchtigt. Das spiegelt sich zum Einen in der Histologie des Gewebes, und zum Anderen in der hohen Proteinkonzentration des Harns, der Proteinurie, wieder, und ist somit ein untrügliches Zeichen einer experimentell induzierten endothelialen Dysfunktion.

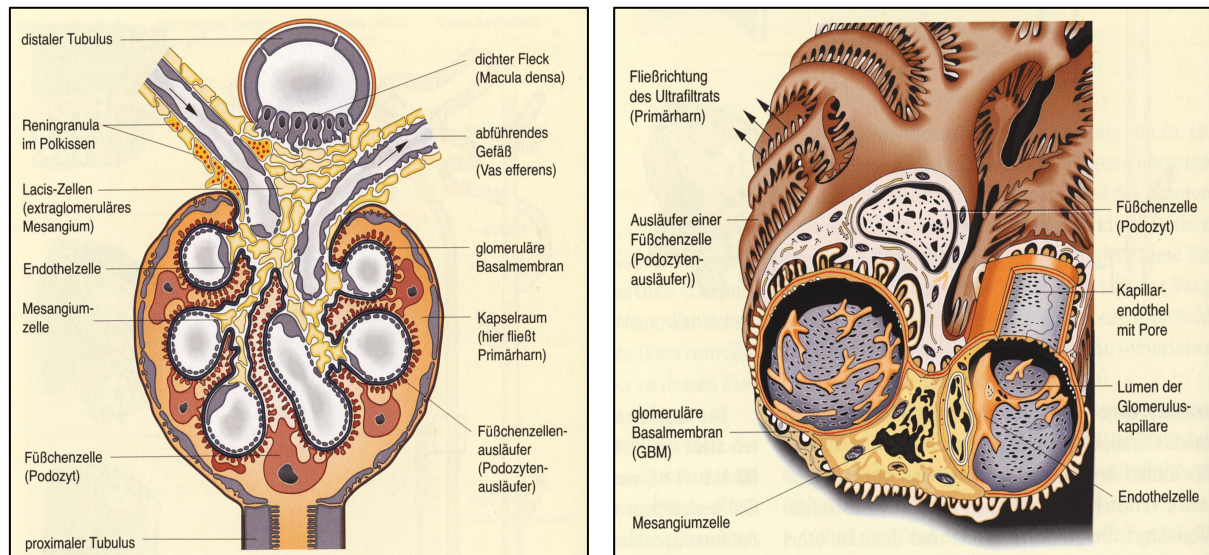


Abb. I.4: Der schematische Aufbau der Niere.

A) Im Anschnitt ist ein Glomerulum gezeigt, die Funktionseinheit der Niere. B) Die Vergrößerung stellt einen Schnitt durch eine glomeruläre Kapillare dar, der insbesondere den 3-schichtigen Filter der Kapillarwand offenlegt. (Spornitz et al. 2004)

5.2 Das Symptom Blutdruckanstieg

Eine weitere Funktion dieses wichtigen Wachstumsfaktors ist die Beteiligung an der Blutdruckregulation. VEGF stimuliert die Freisetzung von Stickstoffmonoxid im Endothel über die endotheliale Stickoxid-Synthase (eNOS). Die Freisetzung bewirkt eine Erhöhung des zyklischen Guanosinmonophosphat und des Stickstoffmonoxid, und damit die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur. Dies führt zur Vasodilatation der Gefäße und damit zur Blutdrucksenkung. Verminderte VEGF-Spiegel haben somit den Anstieg des Blutdrucks zur Folge (Kroll et al. 2000).

Um die systemische Verteilung des sVEGFR-1/ sFlt-1 im Organismus zu simulieren, wurden rekombinante Adenoviren, die das Gen dieses Proteins tragen, intravenös in die Schwanzvene der Maus appliziert. Am murinen Modell eines Ovarialkarzinoms konnte bereits gezeigt werden, dass diese Art der Applikation rekombinanter Adenoviren die Verteilung des Proteins in der Zirkulation zur Folge hat (Mahasreshti et al. 2003). Die Leber weist eine hohe Konzentration des transmembranen Coxsackie-Adenovirus-Rezepors (CAR) auf, über den Adenoviren an Zellen binden und sie infizieren. Aus diesem Grund existiert ein natürlicher

Lebertropismus, so dass ein Großteil der Adenoviren in der Leber akkumuliert (Li et al. 2007). Die Leber stellt also in diesem Modell den primären Ort der exogenen Proteinsynthese dar, verglichen mit Niere oder Plasma. Zur Etablierung des Modells wurde deshalb ebenfalls die Leber in die Untersuchungen mit einbezogen. Dabei wurden die adenovirale Infektion, die quantitative Expression des Zielproteins, sowie der Einfluß dieser Faktoren auf das histologische und morphologische Erscheinungsbild stichprobenartig untersucht.

Die Säulen des vorliegenden Mausmodells zur Präeklampsie mit dem Hintergrund der endothelialen Dysfunktion bilden demnach der Nachweis der Nierenschädigung und der damit verbundenen Proteinurie, sowie die Beobachtung des Bluthochdruckes als Folge der sFlt-1 Überexpression.

6. Adenoviren und adenoviraler Gentransfer

Adenoviren wurden erstmalig 1953 von W. P. Rowe aus Tonsillen und anderem adenoidem Drüsengewebe isoliert und vermehrt. Humanpathogene Adenoviren verursachen überwiegend Erkrankungen der Atemwege, infizieren jedoch auch den Gastrointestinalbereich oder die Bindehaut des Auges. Da bestimmte Subtypen in der Lage sind sowohl proliferierende als auch ruhende Zellpopulationen zu infizieren, werden rekombinante Adenoviren für den therapeutischen Gentransfer eingesetzt (Modrow et al. 1998).

Humane Adenoviren weisen einen Durchmesser von 80 - 110nm auf und besitzen ein 36kb-großes Genom. Ihre DNS ist linear und doppelsträngig, ihr Kapsid ($1,5 \times 10^5$ kDa) hat eine ikosaedrische Symmetrie mit Penton- und Hexon-Kapsomeren, und sie sind membranlos. Diese Merkmale ordnen sie der Familie *Adenoviridae* zu. Humane Adenoviren gehören der Gattung *Mastadenovirus* an und unterteilen sich beim Menschen in weitere Subgenera A-F und Virustypen 1-47 (Modrow et al. 1998). In dieser Arbeit wurde Ad 5 des *Subgenus C* angewendet.

Beim Eintritt in die Zelle bindet das Adenovirus über seine Fiberproteine an den in humanen Zellen vielfach vorkommenden Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor CAR (Cohen et al. 2001). Es folgt eine Rezeptor-vermittelte Endozytose des Virus, wonach das Virus durch einen bislang ungeklärten Mechanismus in das Plasma der Wirtszelle freigegeben wird, und in den Nucleus gelangt (Machens et al. 2000). Dort verbleiben die durch den Virus übertragenen genetischen Informationen epichromosomal, werden also nicht in das Wirtszellgenom integriert. Folglich kommt es zu einer transienten Expression der Transgene über einen Zeitraum von wenigen Tagen bis zu mehreren Wochen (Mathor et al. 1996, Matsushita et al. 1998).

Bei der Expression adenoviraler Gene wird in zwei Phasen unterschieden. So gibt es Gene, die in der frühen Phase der Expression transkribiert werden, die sogenannten „early genes“ E1 bis E4. Diese codieren für regulative Proteine, die das lysierende Wachstum des Virus vermitteln. Die spät abgelesenen Transkripte („late genes“), L II – L VIII werden von einem einzelnen Promotor transkribiert und kodieren für die strukturellen Proteine des Virus, wie Kapsid-Hexone oder Fiberproteine (Modrow et al.1998).

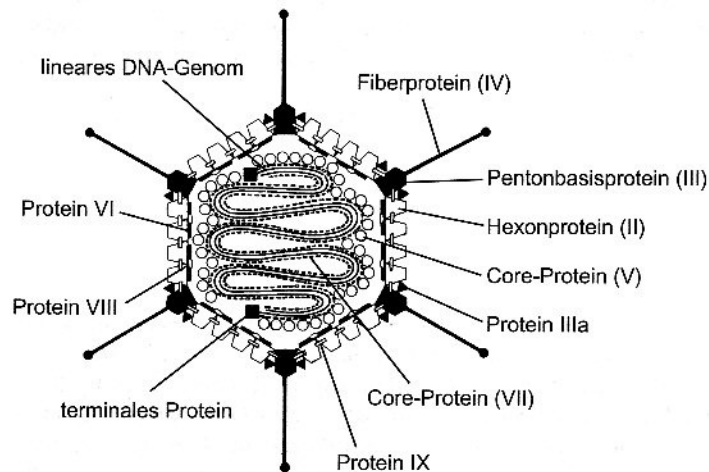


Abb. I.5: Skizze eines Partikel eines Adenovirus. An den 12 Ecken befinden sich Fiberproteine (IV, spikes), die von der Oberfläche hervorragen. Sie sind mit Pentonbasisproteinen (III) assoziiert. Die Seitenflächen werden von Hexonproteinen (II) gebildet. Im Inneren des Partikels befindet sich das lineare doppelsträngige Genom, das mit den Proteinen V, VII und X zu einer Core-Struktur komplexiert ist (Modrow et al. 1998).

6.1 Rekombinante Adenoviren

Um Adenoviren für den Gentransfer einsetzen zu können wurden die für die Replikation und damit für die Zytotoxizität verantwortlichen Gene entfernt (E1-Region). Gleichzeitig erfolgte die Deletion der E3-Region, der Gene die für die Etablierung persistierender adenoviraler Infektionen verantwortlich, für den Infektionszyklus jedoch nicht essentiell sind. Mit der Entfernung der E3-Region wurde Platz für zu transferierendes Genmaterial geschaffen. Zur Kontrolle der Expression des Zielproteins enthält ein Teil der in dieser Arbeit angewandten Adenoviren zusätzlich das Gen für grün fluoreszierendes Protein (eGFP).

Da diese rekombinanten Adenoviren nach Deletion der E1-Region aus sich heraus vermehrungsunfähig sind, wird zur Vermehrung eine transfizierte Helferzelllinie eingesetzt. Die menschliche embryonale Nierenzelllinie HEK 293 (human embryonic kidney) ist stabil mit dem E1-Gen transfiziert und ermöglicht eine Amplifizierung der E1-defizienten Adenoviren. Auf diese Weise können hohe Konzentrationen an Adenoviren hergestellt werden, wie man sie für die Anwendung im Tiermodell benötigt.

7. Blockierende Antikörper

Die Eigenschaft von Antikörpern Proteine spezifisch zu binden wird sowohl in der Forschung als auch in der Routine in Form von Nachweisverfahren genutzt. Eine weitere Anwendung ist der therapeutische Einsatz in der Medizin. Teil dieser Arbeit ist ebenfalls die Entwicklung eines blockierenden Antikörpers. Dieser soll Effekte neutralisieren, die als Folge der adenoviralen Überexpression des natürlichen Inhibitors sFlt-1 in einem Mausmodell gesetzt wurden. Das erfordert die Eigenschaft des Antikörpers, am gleichen Epitop des Antigens zu binden wie der entsprechende Ligand, also die Bindung des Liganden sterisch zu blockieren und so die biologische Wirkungsweise des Inhibitors zu unterbrechen. Weiterhin muss der Antikörper eine hohe Affinität zum Antigen aufweisen, um die kompetitive Bindung gegenüber dem Liganden zu dominieren. Dafür ist ebenfalls eine ausreichend hohe Präsenz des Antikörpers in der Zirkulation erforderlich. Verschiedene Einzelketten-Antikörper (single chain variable fragment – scFv) wurden bereits generiert, indem sie von Matrizen wie der mRNA eines Hybridoms amplifiziert, oder aus einer humanen kombinatorischen scFv - Antikörperbank selektiert wurden (Tagawa et al. 2004, Saldarelli et al. 2005). In dieser Arbeit soll ein bioaktiver hochspezifischer scFv aus einer Immunbibliothek generiert, und spezifische Klone über die Phage-Display Methode isoliert werden. Diese Methode wurde bereits erfolgreich bei der Entwicklung eines anti-VEGFR-2 Antikörpers angewendet (Böldicke et al. 2001). Weltweit existieren zwei blockierende Antikörper gegen Flt-1. Die Rechte daran halten die Firma ImClone (New York, USA) und die Firma BIOVA (Tokio, Japan). Einer dieser angiogenen Inhibitoren wurde von Masabumi Shibuya entwickelt, und wird nun über die Firma BIOVA vertrieben. Die blockierenden Eigenschaften dieses monoklonalen Maus-Antikörpers konnten in Bindungsstudien und Zellkulturexperimenten mit HUVEC und NIH3T3-Flt-1 Zellexperimenten nachgewiesen werden (Kanno et al. 2000). Eine kleine Menge dieses Inhibitors wurde freundlicherweise für vergleichende Experimente von Herrn Prof. Shibuya zur Verfügung gestellt. Ein weiterer blockierender Antikörper gegen den Liganden VEGF wird bereits erfolgreich zur Therapie des kolorektalen Karzinoms angewandt, und die Anwendung ebenfalls bei Brust- und Pankreastumoren sowie beim Nierenzellkarzinom geprüft. Es konnte gezeigt werden, dass dieser monoklonale VEGF-Antikörper Bevacizumab (Avastin®, Genentech, USA) bei der Behandlung das Tumorstadium verlangsamt, indem er die Tumorstigmatisierung hemmt (Ferrara et al. 2004, Yang et al. 2003). Als Nebenwirkung werden überwiegend Symptome aufgelistet, die ebenfalls bei schwerer Präeklampsie auftreten. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass sVEGFR-1/ sFlt1 vorwiegend als Inhibitor VEGF-abhängiger Prozesse agiert.

II Zielsetzung

Ende der Neunziger Jahre wurde beobachtet, dass sich im amniotischen Fluid präeklaptischer Frauen eine erhöhte Konzentration an löslichem VEGFR-1/ Flt-1 befindet (Barleon et al. 1997). Wenig später konnte ebenfalls ein Anstieg dieses Rezeptors im Serum präeklaptischer Frauen nachgewiesen werden (Koga et al. 2003). Schließlich konnten Maynard et al. am Rattenmodell zeigen, dass die adenovirale Überexpression des sVEGFR-1/ sFlt-1 präeklaptische Symptome induziert (Maynard et al. 2003).

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist es, ein Mausmodell zur Präeklampsie zu entwickeln. Dabei soll im ersten Schritt sVEGFR-1/ sFlt-1 adenoviral überexprimiert, und die Auswirkungen der Expression durch Nachweis der Symptome im Modell belegt werden. Im zweiten Schritt soll sFlt-1 komplexiert und beobachtet werden, wie sich die *in-vivo* Komplexbildung auf das Modell auswirkt. Dabei sollen sowohl neutralisierende Antikörper zur Anwendung kommen, als auch die adenovirale Co-Expression des verwandten Liganden VEGF.

III Material und Methoden

1. Material

1.1 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Grundchemikalien in analysenreiner Qualität (p.A.) von den folgenden Herstellern bezogen: Merck, Riedel-de-Haen AG, Serva Feinbiochemica GmbH&Co, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Becton Dickinson, Roth, Fluka, J.T.Baker. Alle Lösungen, Puffer und Medien wurden mit deionisiertem, über eine Milli-Q-Filtrationsanlage (Millipore) aufgereinigtem Wasser angesetzt. Die für die Zellkultur verwendeten Lösungen und Medien wurden für 20min bei einer Temperatur von 121°C und einem Überdruck von 2bar autoklaviert. Hitzelabile Lösungen wurden steril filtriert (Porengröße 0,22µm). Die Zusammensetzungen der jeweils verwendeten Lösungen und Medien sind entweder dem „Maniatis“ (Methodensammlung der Molekularbiologie: Sambrook et al. 1989) entnommen, oder unter den entsprechenden Methoden aufgeführt.

1.2 Verwendete *E.coli*-Stämme

Für die molekularbiologischen Arbeiten wurden chemisch kompetente *E.coli*-DH5α (Fa.Stratagene) und elektrokompente *E.coli*-TG1 (RPAS-Kit, Fa. Amersham Bioscience) eingesetzt.

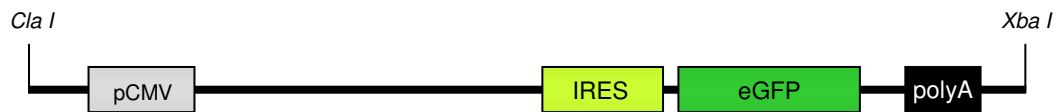
1.3 Humane Zelllinien

Zur Herstellung der Adenoviren wurde die humane embryonale Nierenkarzinomzelllinie 293HEK (American Type Cell Collection, ATCC-Nr. CRL 1573) eingesetzt. Die Überprüfung adenoviraler Proteinexpression sowie Zellkulturexperimente wurden mit der humanen Lungenkarzinomzelllinie A549 (ATCC-Nr. CCL 185) durchgeführt. Die Anzucht und Kultivierung dieser Zellen ist in Kapitel II 4. näher beschrieben.

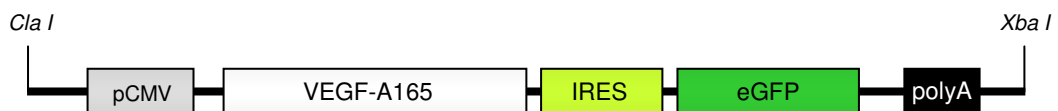
1.4 Adenovirale Konstrukte

In der Arbeit wurden drei adenovirale Konstrukte eingesetzt. Das leere Kontrollviruskonstrukt Ad-eGFP (AdC1-eGFP oder AdC1ieG), das Konstrukt mit dem humanen *vegfa* Gen: AdVEGF-A₁₆₅-eGFP (AdVEGF-A₁₆₅ieG); und das Konstrukt mit dem murinen *sflt-1* Gen, fusioniert an einen murinen Fc-tag: AdmsFIt-1 mFc. Alle verwendeten viralen Konstrukte wurden bereits erfolgreich zur adenoviralen Überexpression eingesetzt (Mayer et al. 2005, Compagni et al. 2000). Die Konstrukte des Kontrollvirus und des VEGF-A-Virus wurden freundlicherweise von Dr. Werner Lindenmaier (HZI Braunschweig), und das Konstrukt des sFIt-1-Virus von Dr. Gerhard Christofori (Universität Basel) zur Verfügung gestellt. Die Herstellung der hohen Konzentrationen, in denen diese rekombinanten Adenoviren benötigt wurden, erfolgte mit großem Zeitaufwand im Rahmen der vorliegenden Arbeit, und wird in Kapitel III. 5 näher beschrieben.

Ad eGFP:



Ad VEGF-A₁₆₅-eGFP:



Ad msFIt-1 mFc:



Abb. III.1: Schematische Darstellung der Expressionskassetten angewandter Adenoviren bestehend aus dem CMV-Promotor, dem zu exprimierenden Gen (VEGF-A165 oder murines sFIt-1 mit murinem Fc-tag) im ersten Cistron, der IRES –Sequenz, und dem egfp-Gen im zweiten Cistron. Hinter dem egfp-Gen folgt eine SV40 Poly-A Sequenz. CMV- cytomegaly virus, IRES- internal ribosomal entry site, eGFP- enhanced green fluorescent protein

1.5 Oligonukleotidsequenzen

Im Rahmen der Arbeit wurden verschiedene Oligonukleotidsequenzen zur Amplifikation eingesetzt. Alle Primer lagen in einer Stocklösung von 100µM vor, die Konzentration der Arbeitslösung betrug 10µM.

Eingesetzte Oligonukleotide zur Entwicklung eines einzel-kettigen Antikörpers

Die hier aufgeführten Primersequenzen entstammen einer Literatur zur Herstellung einzelkettiger Antikörper über die Methode der Phagenselektion (McCafferty et al, 1996). Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der schweren und leichten Ketten, das Verbinden der Ketten durch ein Linkerfragment sowie das Anfügen der Restriktionsschnittstellen wurde nach Protokollen des RPAS-Kits und dem Kit beigefügten Reagenzien durchgeführt. Zusätzlich wurden Primermischungen des RPAS-Kit-Systems angewandt, deren Sequenz nicht bekannt war (RPAS: Recombinant Phage Antibody System, Fa. Amersham Bioscience, jetzt GE).

Name	Zweck	Sequenz 5' → 3'
VH1Back	Generieren schwerer Ketten	AGG TSM ARC TGC AGS AGT CWG G
VH1FOR-2	Generieren schwerer Ketten	TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC TTG GCC CC
VK2Back	Generieren leichter Ketten	GAC ATT GAG CTC ACC CAG TCT CCA
MJK1FONX	Generieren leichter Ketten	CCG TTT GAT TTC CAG CTT GGT GCC
MJK2FONX	Generieren leichter Ketten	CCG TTT TAT TTC CAG CTT GGT CCC
MJK4FONX	Generieren leichter Ketten	CCG TTT TAT TTC CAA CTT TGT CCC
MJK5FONX	Generieren leichter Ketten	CCG TTT CAG CTC CAG CTT GGT CCC
VH1Back SFI 1	Anfügen von Restriktionsenden	GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTS MAR CTG CAG SAG TCW GG
JK1 NOT 1	Anfügen von Restriktionsenden	GAG TCA TTC TGC GGC CGC CCG TTT GAT TTC CAG CTT GGT GCC
JK2 NOT 1	Anfügen von Restriktionsenden	GAG TCA TTC TGC GGC CGC CCG TTT TAT TTC CAG CTT GGT CCC
JK4 NOT 1	Anfügen von Restriktionsenden	GAG TCA TTC TGC GGC CGC CCG TTT TAT TTC CAA CTT TGT CCC
JK5 NOT 1	Anfügen von Restriktionsenden	GAG TCA TTC TGC GGC CGC CCG TTT CAG CTC CAG CTT GGT CCC

Tab. III.1: Überblick der Primersequenzen zur Generation der Ketten.

Die Tabelle zeigt die für die Amplifikation der schweren und leichten Ketten eingesetzten Primersequenzen, sowie die Primer zur Einfügung von Restriktionsschnittstellen an die Basis-Antikörper-Sequenz. Primersequenzen des RPAS-Systems waren nicht bekannt.

Eingesetzte Oligonukleotide für die RT-PCR zum Nachweis von Transkripten im Tiermodell

Name	Bindung	Primersequenz 5' --> 3'	[°C]	Produkt [bp]	Quelle
GFP WLI for	eGFP	CGC TAC CCC GAC CAC ATG AA	57	307	W.Lindenmaier
GFP WLI rev		CTG CCG TCC TCG ATG TTG TG	59		W.Lindenmaier
ActMRHPfwd	β-Actin	GAC GAG GCC CAG AGC AAG AG	59	780	K.Greger
ActMRHPrev		ATC TCC TTC TGC ATC CTG TC	59		K.Greger
mVEGF for	mVEGF-A	GAC CCT GGT GGA CAT CTT CCA GGA	63	330/ 462/ 514	Hara 2006
mVEGF rev		GGT GAG AGG TCT GGT TCC CGA	62		Hara 2006
VEGF-A ₁₆₅ for	VEGF-A ₁₆₅	GGC AGA AGG AGG AGG GCA G	69	350	A.Bergmann
VEGF-A ₁₆₅ rev		GGC CCA CAG GGA TTT TCT TGT C	68		A.Bergmann
mFlt-1 forw	mFlt-1	CGC GGG ACG GCG AGG ATC CC	55	505	K.Greger
mFlt-1 rev		CCG ATA GGA GCG GCC GCC TGC TGT G	55		K.Greger
mBanksB	msFlt-1	ATC CGC TGG GAG CAG ACA AGT CC	55	500	Banks et al.
mGK4		TTA ATG TTT GAC ATG ACT TTG TG	55		K.Greger
mKDR for	Flk-1	AGA ACA CCA AAA GAG AGG AAC G	55	382	K.Greger
mKDR rev		GCA CAC AGG CAG AAA CCA GTA G	55		K.Greger
Me for	mEndoglin	GAC CCT GGT GGA CAT CTT CCA GGA	63	428	StJaques 1994
Mf rev		AGA GGC TGT CCA TGT CGA TGC	60		StJaques 1994
mPIGF for	mPIGF	CAC TTG CTT CTT ACA GGT CC	55	200	Feeney 2003
mPIGF rev		CAC CTC ATC AGG GTA TTC AT	53		Feeney 2003
mNeph for	mNephrin	CCC AAC ACT GGA AGA GGT GT	58	211	Fan 2004
mNeph rev		CTG GTC GTA GAT TCC CCT TG	58		Fan 2004
mPod for	mPodocin	TGA GGA TGG CGG CTG AGA T	58	193	Fan 2004
mPod rev		GGT TTG GAG GAA CTT GGG T	55		Fan 2004

Tab. III. 2: Überblick der Primersequenzen zum Nachweis von Transkripten

Die Tabelle zeigt die für RT-PCR eingesetzten Oligonukleotide, einschließlich deren Anlagerungstemperatur und PCR-Produktgröße.

1.6 Antikörper

Die folgende Übersicht zeigt die in der Arbeit eingesetzten Antikörper.

Primäre Antikörper					
Antigen	Klon	Spezies	Methode	Verdünnung	Quelle
human sFlt-1	FLT-11	Maus	WB	1:750	H.Weich
mFlt-1	Polyklonal	Ziege	ELISA	1:180	R&D
VEGF-A	K2668	Kaninchen	ELISA	1:140	H.Weich
Sekundäre Antikörper					
Ziel-Struktur	Klon	Marker	Methode	Verdünnung	Quelle
Mouse IgG	Polyklonal	AP	WB	1:2500	Fa.Promega
mFlt-1		Biotin	ELISA	1:180	R&D
VEGF-A	K2668	Biotin	ELISA	1:100	H.Weich

Tab. III. 3: Überblick angewendeter Antikörper

Die Tabelle zeigt die im WesternBlot (WB) und im Enzyme Linked Immuno Assay (ELISA) eingesetzten Antikörper und deren Verdünnung.

2. Molekularbiologische Methoden

2.1 Isolation von Nukleinsäuren

Die Isolierung von **Plasmid-DNS** erfolgte über kleine Chromatographiesäulen mit Hilfe eines „Plasmid Miniprep Spinkits/ 50“ der Firma Genomed (Fa.Genomed, Bad Oeynhausen). Alternativ kam ein Protokoll von M.Wilimzig (Universität Hamburg) zur Anwendung. Diese Methode enthält Lithiumchlorid zur Entfernung von rRNS und Proteinaggregaten, und beugt so weiteren Aufreinigungsschritten vor (Holmes et. al 1981). Die Bakteriensuspension einer Übernachtskultur (2mL) wurde bei Raumtemperatur für 10min bei 6800g pelletiert, und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100µL TELT-Puffer (50mM TRIS-HCl; 62,5mM EDTA; 0,4% Triton X-100; 2,5M LiCl, pH7,5) resuspendiert, und 10µL einer frisch hergestellten wässrigen Lysozymlösung (10mg/mL) zugegeben. Um genomische DNS zu entfernen wurde nach dem Durchmischen die Suspension für 1min auf 95°C erhitzt, und danach für 5min auf Eis inkubiert. Die Abtrennung der Plasmid-DNS von der genomischen DNS erfolgte bei Raumtemperatur und 20.800g über 15min. Das entstandene Pellet konnte mit einem Zahnstocher gepickt und entfernt werden. Die resultierende Plasmid-DNS wurde mit 200µL eiskaltem 96%-igem Ethanol bei -70°C für mindestens 30min präzipitiert. Die Pelletierung der Präzipitate erfolgte bei 4°C und 20.800g für 10min. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 500µL 70%-igem eiskaltem Ethanol gespült, und erneut bei 20.800g und 4°C für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, und das gewaschene Pellet 5min bei 37°C oder 15min bei Raumtemperatur getrocknet. Die pelletierte Plasmid-DNS konnte nun in 50µL TE-Puffer resuspendiert werden. Nach dem Lösen der DNS erfolgte die Konzentrationsbestimmung in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 260/ 280nm.

Die Isolierung von **gesamter RNS** erfolgte mit TRIzol-Reagenz (Fa. Invitrogen, Karlsruhe). Dieses Reagenz enthält Phenol und Guanidinisothiozyanat (saure Phenolmethode). Dabei wurde nach dem beiliegenden Protokoll des Herstellers gearbeitet, und für adhärente Zellen 1mL TRIzol pro Vertiefung einer 6well-Schale, bzw. 1mL TRIzol auf ca. 100mg Gewebe eingesetzt (Chomczynski et. al 1987). Bei der Gewinnung von RNS aus adhärennten Zellen wurde die TRIzol-Reagenz 5min auf dem mediumfreien Zelllayer inkubiert, und der chemische Aufschluß der Zellen anschließend durch Auf- und Abpipettieren unterstützt. Zur RNS-Isolierung aus Gewebe erfolgte nach der TRIzol-Zugabe eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit anschließendem mechanischen Aufschluß der Zellen durch einen Dispergierstab. Die TRIzol-Zelllösung wurde dann weiter aufgearbeitet oder bei -70°C bis zur

Aufarbeitung gelagert. Die aufgetaute TRIzol-Lösung wurde mit 0,2mL Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, sofort 15sec geschüttelt, 5min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 4°C mit 20.000 x g 30 min zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Phase entnommen und mit 0,5mL Isopropanol vermischt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNS mittels Zentrifugation (4°C, 15 min, 20.000 x g) pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen, und 5min bei 37°C oder 15min bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 100µl Nuklease-freiem TE-Puffer 5min bei 60°C gelöst, und unter Zugabe von 250µl 96 % Ethanol und 10µl 2M Natriumazetat, pH 5,5 nach dem Mischen mindestens 30min bei -70°C präzipitiert. Zur Quantifizierung wurden jeweils 50µl der gut durchmischten RNA-Suspension entnommen, mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Nach dem Lösen in TE-Puffer wurde die Optische Dichte bei 260/ 280 nm im Photometer bestimmt. Dabei entspricht die $OD_{260}=1$ der Menge von 40µg/ml RNA.

Die Präparation von **mRNS** erfolgte mit Hilfe des „MicroPoly(A) Purist™-Kit“ (Fa.Ambion).

2.2. Die Synthese von cDNS

Zur Synthese von cDNS wurden entweder 20-150ng mRNS oder 1-5µg gesamter RNS eingesetzt. Dabei kam der „First-Strand cDNA Synthesis Kit“ (Fa. GE) zur Anwendung. Um die RNS-Stränge zu trennen, erfolgte ein initiales Aufheizen der Lösung über 10min bei 65°C. Die RNS wurde danach mit der Reverse Transkriptase-Enzymlösung versetzt, 1h bei 37°C inkubiert, die Reaktion durch Inaktivieren des Enzyms 5min bei 90°C beendet, und anschließend auf Eis abgekühlt.

Alternativ kam eine Methode nach Dr. Andrea Hoffmann zur Anwendung. 10,6µL RNS (1-5µg) und 1µL oligo(dT)-Primer (0,5µg/mL) wurden 10min bei 70°C erhitzt, kurz auf Eis abgekühlt und dann die auf 37°C erwärmte Puffermischung zupipettiert. Diese setzte sich pro Ansatz zusammen aus 4µL 5x-Puffer der Reversen Transkriptase; 2µL 0,1M DTT; 1µL 0,01M dNTPs und 0,4µL RNAsin Inhibitor (16unit, Fa.Promega, Madison, USA). Die Zugabe von 1µL Reverse Transkriptase (200unit, MML-V, Fa. Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien/USA) erfolgte nach der Erwärmung der Puffermischung. Nach einer Inkubationszeit von 1h bei 37°C wurde die Reaktion durch Inaktivieren des Enzyms 10min bei 94°C abgebrochen, und auf Eis abgekühlt.

Die Aufbewahrung der cDNS erfolgte bei -20°C.

2.3 Die Phenol/ Chloroform Extraktion und die alkoholische DNS-Fällung

Zur Aufreinigung von DNS-Ansätzen von verunreinigenden Proteinen wurde eine Phenol/ Chloroform Extraktion durchgeführt. Die DNS-Probe wurde dafür zunächst auf 250µL Volumen mit Wasser eingestellt, mit dem gleichen Volumen 250µL Phenol versetzt, durch mehrmaliges invertieren gemischt, zusätzlich ein gleiches Volumen von 250µL an Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) zugegeben, wieder durch invertieren gemischt und dann die Phasentrennung beschleunigt für 5min bei 20800g. Die wässrige DNS-haltige Oberphase wurde vorsichtig abgenommen, erneut mit dem gleichen Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) versetzt, gemischt und die Phasen getrennt wie oben beschrieben. Die DNS der wässrigen Oberphase wurde nun mit 2,5 Vol. eiskaltem 96% Ethanol und 0,1Vol. 2M Na-Azetat versetzt, gut durchmischt, und die DNS für mindestens 30min bei -70°C gefällt. Anschließend erfolgte das Pelletieren der DNS-Präzipitate für 30min bei 4°C und 20800g. Das Pellet wurde 5min bei 37°C oder 15min bei Raumtemperatur getrocknet, und in einer entsprechenden Menge TE-Puffer pH7,5 aufgenommen. Die DNS wurde dann weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

2.4 Die Restriktion von DNS

Für den Restriktionsverdau von DNS wurden durchschnittlich 0,5µg DNS und 0,5unit/µL Restriktionsenzym eingesetzt. Die Restriktionsenzyme (Fa. NewEnglandBiolabs) wurden entsprechend den beigelegten Hinweisen mit passendem Puffer und BSA angewandt. Das Reaktionsvolumen lag je nach Anwendung zwischen 20 und 50µL. Ein klassischer 20µL-Restriktionsverdau umfasste 15µL deionisiertes Wasser, 2µL DNS (0,5µg), 2µL 10x Enzym-Puffer, 1µL Restriktionsenzym (10unit). Der DNS-Verdau erfolgte 1h bei 37°C, soweit das Temperaturoptimum des Enzyms nicht bei einer anderen Temperatur lag. Die Restriktionsfragmente wurden dann im TBE-Agarosegel aufgetrennt, und im Ethidiumbromid-Bad (II 2.10) gefärbt. Die rechnergestützte Planung und Auswertung der Konstrukte erfolgte mit der Software „VectorNTI®“, (Fa. Invitrogen).

2.5 Die Ligation von Fragmenten

Die Ligation von DNS-Fragmenten in Plasmid-DNS setzt kompatible Restriktionsschnittstellen voraus. Die T4-DNS-Ligase katalysiert die Verknüpfung zweier DNS-Stränge zwischen dem 5'-Phosphat und der 3'- Hydroxy-Gruppe angrenzender Nukleotide in einer Konfiguration mit kohäsiven oder glatten Enden (Engler et. al 1982). Die

klassische Ligation umfasste 1µL 10x T4-Ligase-Puffer, 1µL 10mM ATP, 1µL T4-DNS-Ligase (3u/µL, Fa. Promega) und 7µL DNS in TE-Puffer. Dieser Ansatz wurde gut durchmischt und anschließend entweder 30min bei 37°C, 3-4h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.6 Die Transformation von DNS in kompetente Zellen

Zur **chemischen Transformation** der Ligation wurden je Transformationsansatz 50µL chemisch kompetente *E.coli* DH5α Zellen (Fa. Stratagene) vorsichtig auf Eis aufgetaut. Die Ligation wurde ebenfalls auf Eis vorgekühlt, und 1:10 mit deionisiertem Wasser verdünnt. Von dieser Verdünnung wurde vorsichtig 1µL zu den kompetenten Zellen pipettiert, und schonend vermischt. Nach einer weiteren 30minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für genau 45sec im exakt temperierten 42°C Wasserbad. Nach dem 2minütigen Abkühlen der Zellen auf Eis wurden 450µL auf Raumtemperatur temperiertes SOC-Medium zugegeben, und die Transformationen 1h bei 37°C unter ständigem schonenden Mischen im Rotator inkubiert. Im Anschluß daran erfolgte das Ausplattieren von je 100µL und 400µL der Transformationen auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten (50µg/mL Ampicillin), und die Inkubation der Platten bei 37°C über Nacht.

Zur **Elektroporation** wurden im Vorfeld Salze und Proteine aus der Ligation entfernt. Dazu wurde die Ligation mit Phenol-Chloroform (Fa. Roth) 1:1 versetzt, 15sec geschüttelt, und die Phasen bei 20.800g für 5min separiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen, nochmals mit Chloroform (Fa. Roth) 1:1 versetzt, die Phasen wiederum separiert und die wässrige Phase dann mit 2,5 Volumen eiskaltem 96% Ethanol und 1/10 Volumen 3M Natriumazetat 1h bei -70°C gefällt. Nach dem Pelletieren bei 20.800g für 5min bei 4°C wurde die DNS mit 1mL 70%-igem eiskaltem Ethanol gewaschen, erneut bei 20.800g für 5min bei 4°C pelletiert und schließlich in 20µL deionisiertem Wasser (pH7,5) gelöst.

Zur Elektroporation wurden die elektrokompetenten *E.coli* TG1 Zellen (RPAS-Kit, Fa. AmershamBioscience) vorsichtig auf Eis aufgetaut, und die 0,2cm-Küvetten und der Küvettenschlitten ebenfalls vorgekühlt. Die 50µL Zellen wurden dann vorsichtig in die kalte Küvette transferiert, 2µL der salzfreien Ligation hinzupipettiert und das Transformationsgemisch blasenfrei auf den Küvettenboden geschlagen. Küvettenschlitten und Küvette wurden abgetrocknet. Die Küvette wurde dann in das Gerät gestellt, und bei den Einstellungen 25µF, 2,5kV und 200ohm gepulst. Zeitkonstanten zwischen 4,5 und 5ms

zeigten eine ordnungsgemäße Elektroporation an. Unmittelbar nach dem Pulsen erfolgte die Zugabe von 1mL frischem LB-Medium zu den gepulsten Zellen, und sie wurden in ein anderes Gefäß überführt. Die Transformationen wurden 1h bei 37°C unter ständigem schonendem Mischen im Rotator inkubiert. Im Anschluß daran erfolgte das Ausplattieren von je 100µL und 400µL der Transformationen auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten (50µg/mL Ampicillin), und die Inkubation der Platten bei 37°C über Nacht.

2.7 Die Herstellung von kompetenten Zellen

Zur Herstellung von elektrokompetenten *E.coli* TG1 Zellen wurden 10mL 2xYT-Medium (17g Bacto-Trypton, 10g Bacto-Hefeextrakt, 5g NaCl gelöst in 1l Wasser und autoklaviert) mit einer Kolonie dieses Stammes im 100mL Kolben angeimpft, und über Nacht bei 37°C und 180rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2x 500mL 2xYT-Medium mit je 3,5mL der Übernachtskultur beimpft, und ca. 1,5h bei 37°C und 180rpm inkubiert bis zu einer $OD_{600}=0,5$. Die Kultur wurde daraufhin in 4x 500mL-Zentrifugenbecher (je 250mL) gefüllt, und 30min unter mehrmaligem Mischen gleichmäßig auf Eis abgekühlt, um einen Temperaturgradienten zu vermeiden. Im Anschluß daran erfolgte das Sedimentieren der Zellen bei 3.000g für 15min bei 4°C. Danach wurden die Zellen in 4x250mL eiskaltem sterilem 1mM-HEPES-Puffer (119,15g HEPES-Pulver in Wasser, pH7,0, steril filtrieren) resuspendiert. Die Zellen wurden erneut sedimentiert und diesmal in 4x125mL eiskaltem sterilem 1mM-HEPES-Puffer resuspendiert. Es folgte eine dritte Sedimentation und die Resuspendierung in 2x10mL eiskaltem sterilem 1mM-HEPES-Puffer mit 10% Glycerol. Danach wurden die Zellen auf 20mL vereinigt und wiederholt sedimentiert. Das Pellet wurde in 3mL sterilem 10% Glycerol resuspendiert, die Zellen zu je 100µL aliquotiert und unverzüglich in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die fertigen kompetenten Zellen wurden dann bei -70°C gelagert. Der gesamte Vorgang wurde im 4°C Raum mit vorgekühlten Reaktionsgefäßen und Geräten durchgeführt.

2.8 Die Herstellung von Glycerolkulturen

Glycerolkulturen wurden hergestellt um Bakterien über lange Perioden hinweg aufzubewahren. Dafür wurden 5mL LB-Medium mit einer Einzelkolonie des betreffenden Stammes von einer Minimalagarplatte beimpft, und über Nacht bei 37°C unter Schütteln bei 250rpm inkubiert. Zur Herstellung der Glycerolstock-Kulturen wurden je 900µL der Übernachtskultur der Zellen in der stationären Phase mit 250µL sterilem 80%-igem Glycerol versetzt, gut gemischt und bei -70°C aufbewahrt.

2.9 Die RT-PCR und die Sequenzierung

Für die **RT-PCR** wurde ein Standardprotokoll verwendet. Abweichungen sowie Anlagerungstemperaturen von Primersequenzen wurden in der Liste der Primer vermerkt (III 1.5). Das Standard-PCR-Protokoll umfasste für einen 20µL-Ansatz 1,6µL 2,5mM dNTPs; 1,2µL 25mM MgCl₂; 4µL 5x PCR-Puffer; 2,5µL 10µM Primer forward; 2,5µL 10µM Primer reverse; 0,25µL Taq-Polymerase (5u/µL, Fa.Promega); 7,95µL cDNS in Wasser. Das Standard-PCR-Programm lautete: 1x(95°C,5min) 29x(94°C,60sec/ 55°C,60sec/ 72°C,90sec) 1x(72°C,5min)1x(15°C,24h). Das PCR-Produkt wurde über Agarosegelelektrophorese überprüft, und teilweise nach Gelelution weiterverarbeitet. Die Gelelution erfolgte dann mit dem „Jetsorb Gel Extraction Kit/ 150“ (Fa. Genomed).

Die **Sequenzierung** wurde nach dem Protokoll des „Big Dye ® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit“ (Fa. Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Das Protokoll lautete wie folgt: 1µL DNS (600ng); 4µL 5x ABI-Puffer; 4µL ABI-Enzymmischung; 4µL Sequenzierprimer (1pmol/µL); auf 20µL mit deionisiertem Wasser auffüllen. Die Proben wurden im PCR-Cycler bei folgendem Programm inkubiert: 25x(96°C, 30sec/ 50°C, 15sec/ 60°C, 4min). Nach der Sequenzierreaktion wurde die amplifizierte DNS durch eine Aufreinigung von störenden Resten der Reaktion getrennt. Die Proben wurden mit 150µL Präzipitationsmix (20mL H₂O; 4mL 3M Na-Azetat pH5,2; 100mL Ethanol) versetzt und die DNS 15min bei Raumtemperatur gefällt. Die Präzipitate wurden bei 11.700g für 30min bei Raumtemperatur pelletiert, die Pellets mit 150µL 70%-igem Ethanol gewaschen, und erneut pelletiert. Das Abziehen der überschüssigen Flüssigkeit erfolgte hierbei mit einer ausgezogenen Pasteurpipette. Nach dem Trocknen des Pellets für 5min bei 37°C wurde die DNS vorsichtig in 12,5µL „Template Repression Reagenz“ gelöst, 2min bei 95°C inkubiert und 1min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde die gelöste DNS in Spezialröhrchen der Fa. Applied Biosystems überführt, und die Sequenz mittels einem „ABI Prism® 310 Genetic Analyzer“ System identifiziert. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte über die Software „Chromas“ (Fa. Digital River GmbH, www.technelysium.com.au) und „VectorNTI“ (Fa. Invitrogen).

2.10 Die elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Die elektrophoretische Auftrennung von **DNS** erfolgte im TBE-Agarosegel bei einer Spannung von 100V. Für Fragmente größer als 5kb erfolgte die Auftrennung in 0,5% Agarose, für Fragmente zwischen 1kb und 5kb in 1% Agarose, und für Fragmente kleiner 1kb

in 2% Agarose. Nach erfolgtem Lauf wurde die DNS im Ethidiumbromid-Bad (1µg/mL in 500mL 1xTBE-Puffer) für 20min angefärbt und anschließend im Wasserbad für 5min entfärbt. Durch in die DNS interkalierendes Ethidiumbromid konnte das erhaltene Bandenmuster auf einem UV-Transilluminator bis zu einer Konzentration von 5ng sichtbar, und fotografisch dokumentiert werden. Als Größenmarker wurde eine 100bp-DNS Leiter (100-1.517bp) und eine 2-log DNS Leiter (100 – 10.000bp) eingesetzt (Fa. NEB, Ipswich, MA/USA).

Die Kontrolle der **RNS** Qualität erfolgte durch ein denaturierendes 1,25% Oberflächenspannungsgel nach Dr.Kenneth Rosen. Dafür wurde 1g Agarose in 60mL deionisiertem Wasser aufgeköcht, auf ca. 60°C abgekühlt, und danach unter dem Abzug mit 14,2mL deionisiertem Formaldehyde und 8mL 10x MOPS-Puffer (0,2M MOPS; 0,01M Na-Azetat pH7,0; 0,01M EDTA) versetzt. Diese Mischung wurde erneut auf 40°C abgekühlt, und dann auf eine Glasplatte gegossen wo sie sich aufgrund der Oberflächenspannung verteilte und nach 30min gelierte. Kurz vor dem Laden des Gels wurde der Kamm unter einem Wasserfilm vorsichtig gezogen. Zur Vorbereitung der Proben wurde die RNS (5-15µg/lane) gefällt und in 2µL DEPC-Wasser aufgenommen. Dieses Volumen wurde mit 9µL frisch präpariertem RNS-Probenpuffer (6µL 10xMOPS-Puffer; 30µL deionisiertes Formamide; 6µL Ethidiumbromid (0,5mg/mL); 12µL deionisiertes Formaldehyd) versetzt, gemischt, 10min bei 65°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert. Danach wurde je 1µL Farbpuffer (Bromphenolblau 2,5mg/mL; 50% Glycerol; 10mM EDTA) zugegeben, nochmals abzentrifugiert und die Proben vorsichtig in die Taschen aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in einer Pufferkammer mit zirkulierendem Puffer durchgeführt, um einem pH-Gradienten vorzubeugen. Der Gellauf erfolgte über 4h bei 66V im Dunkeln. Nach dem Lauf konnten die Bandenmuster, wie beim DNS-Gel bereits beschrieben, im UV-Licht detektiert werden. Als Qualitätsmerkmal galten hierbei deutlich sichtbare Banden der 18s und der 28s RNS, wobei die Intensität der 28s RNS doppelt so stark wie die der 18s ausfallen sollte.

3. Proteinchemische Methoden

3.1 Die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay

Zur Bestimmung von Gesamtprotein in kleinen Probenmengen wurde der BCA-Assay eingesetzt (Fa. PIERCE-Perbio, Rockford, USA). Dieser Assay basiert auf der Reaktion reduzierter Cu^+ -Ionen mit Bicinchoninsäure (BCA). Gesamtprotein geht dabei mit Cu^{2+} Ionen einen stabilen Komplex ein, in dessen Folge die Ionen reduziert werden. Die reduzierten Ionen bilden dann mit Bicinchoninsäure einen violetten Farbkomplex, dessen Intensität sich direkt proportional zur Proteinkonzentration verhält. Über eine Eichreihe erfolgt die Auswertung. Gemäß den Angaben des Herstellers wurden 50 μl der Proteinprobe mit 950 μl der fertigen BCA-Reagenz (frisch angesetzt, Reagenz B 1:50 in Reagenz A verdünnt) versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 65°C wurde im Photometer bei 562 nm die Extinktion innerhalb von 10min bestimmt. Der Proteingehalt wurde aus einer Kalibrierreihe ermittelt, die in einem Parallelansatz mit BSA in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 10 $\mu\text{g/ml}$ erstellt wurde.

3.2 Die Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE

Zur analytischen Trennung von Proteinen wurde nach der Methode von Laemmli eine Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) in vertikalen Gelkammern (Mini-Protean II von Biorad, München) durchgeführt (Sambrook et al. 1989). Durch Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) wurde gewährleistet, dass eine Auftrennung nach der Ladung der Proteine und damit nach der unterschiedlichen Molekularmasse erfolgte. Die proteinhaltigen Proben wurden in 4 x SDS-Probenpuffer (1ml 0,5M Tris-HCl, pH 6,8; 4ml Wasser, 0,8ml 30% (v/v) Glycerin; 1,6ml 10% SDS; 0,05 % Bromphenolblau) aufgenommen, dem 5% β -Mercaptoethanol zum Denaturieren der Proteine kurzfristig hinzugefügt wurde. Danach wurden sie 10 min bei 95°C inkubiert. Nach dem Auftrag auf das Gel wurde bis zum Eindringen in das Sammelgel bei 90V und danach für 45 min bei 190V elektrophoretisiert. Zur Standardisierung wurde ein Größenmarker von 7 kDa bis 200 kDa benutzt.

3.3 Der Nachweis von Gesamtprotein mittels Silberfärbung

Die im Harn enthaltenen Substanzen wie Harnsäure und Creatinin stellen interferierende Substanzen beim Proteinnachweis über den BCA- oder den Bradford-Assay dar (vgl. Beilage beider Assays). Aus diesem Grund erfolgte der Nachweis von Gesamtprotein im Harn über die Methode der Silberfärbung. Der Reaktion liegt die Komplexbildung von Silberionen mit

Glutamin- Asparagin- und Cystein-Resten der Proteine, und der darauffolgenden Bildung eines braunen Niederschlags zugrunde, dessen Intensität direkt proportional der Konzentration des jeweiligen Proteins ist. Dafür wurden die Proteine als erstes mittels SDS-PAGE aufgetrennt, und anschließend mit Hilfe des „Owl silver stain Kit“ markiert (Fa. Thermo Fisher Scientific, New York, USA).

3.4 Der spezifische Proteinnachweis im Western-Blot

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe der SemiDry-Methode auf eine PVDF-Membran transferiert. Die hydrophobe Membran wurde zuerst mit Methanol benetzt, dann zusammen mit dem Proteingel 30 min in Transferpuffer (48mM Tris-Base, 39mM Glycin, 0,037% SDS, 20% Methanol) äquilibriert. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte in Transferpuffer für 1h bei 15V pro Minigel. Zur Identifikation der Proteine durch spezifische Antikörper wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran 30min bei Raumtemperatur unter leichten Schwenkbewegungen mit TBSM (50mM Tris-Base, 137mM NaCl, 3mM KCl, pH7,0 + 10% Milch) abgesättigt. Anschließend folgte die Inkubation des primären monoklonalen Antikörpers in TBSM für 1 Stunde. Die Membran wurde danach 3 x für jeweils 5 min in TBST (TBS + 0,05 % Tween-20) gewaschen und mit dem sekundären Antikörper, der mit einer Peroxidase gekoppelt ist, für 1 weitere Stunde in TBSM inkubiert. Die Waschschrte erfolgten wie zuvor beschrieben. Zur Detektion der Proteine wurde der Blot mit einer Peroxidase-Substratlösung überschichtet, deren Substratumsetzung in violetten Banden resultierte.

3.5 Der Spezifische quantitative Proteinnachweis im ELISA

Zur Bestimmung von spezifischen Proteinkonzentrationen von murinem sFlt-1 und humanem VEGF-A in Zellkulturüberständen und Gewebelysaten wurde ein Sandwich-ELISA eingesetzt. Die Messung der Proben erfolgte jeweils in Duplikaten in 96-Loch-Platten. Alle Schritte wurden bei Raumpemperatur durchgeführt.

muriner sFlt-1-ELISA

Der Nachweis von freiem murinem sFlt-1 erfolgte mit Hilfe des „Mouse sVEGFR1/Flt-1 ECD DuoSet“ Kits (Fa. R&D, Minneapolis, USA). Das Protokoll des Herstellers wurde leicht modifiziert angewendet. Die Platten (#469914, Fa.Nunc) wurden dafür mit 50µl/Loch Primärantikörper (goat anti-mouseFlt-1-Antikörper, 0,8µg/mL in PBS) über Nacht beschichtet und anschließend mit 300 µl/Loch Waschpuffer (PBS, 0,05 % Tween-20) dreimal gewaschen.

Es folgte die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 Stunde mit 200µl/Loch Assaypuffer (1% BSA in PBS). Die weiteren Inkubationsschritte wurden nun auf einem Orbitalschüttler bei 150 rpm durchgeführt und durch drei Waschschrte unterbrochen. Das Volumen der eingesetzten Lösungen betrug 100 µl/Loch. Die Proben wurden, wenn notwendig in Assaypuffer verdünnt, ansonsten unverdünnt, neben einem sFlt-1- Standard eingesetzt und für 2h inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem biotinylierten Detektionsantikörpers (goat anti-mouseFlt-1-Antikörper, 0,3µg/mL in 1%BSA + 1% goat Serum in PBS) und eine weitere 20-minütige Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (Fa. Pierce/Endogen, Woburn, USA; 1:10.000 verdünnt in PBS + 1% BSA). Nach Zugabe von TMB-Substrat (Tetra-Methyl-Benzidin, Boehringer, Mannheim) und Abstoppen der Reaktion mit 50µl/Loch 0,5M H₂SO₄ wurde die Absorption bei 450 nm und 620 nm (als Referenz) gemessen.

Humaner VEGF-A ELISA

Der Nachweis von freiem humanem VEGF-A erfolgte mit Hilfe eines selbst entwickelten Sandwich-ELISAs (Toi et al. 2002). Die Platten (#469914, Fa.Nunc) wurden dafür mit 50µl/Loch Primärantikörper (anti-VEGF-A-Antikörper, K2668, ProteinA gereinigt; 20µg/mL in PBS) 2h bei 37°C beschichtet und anschließend mit 300 µl/Loch Waschpuffer (PBS; 0,05 % Tween-20) dreimal gewaschen. Es folgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen über Nacht bei 4°C mit 300µl/Loch Absättiger (PBS + 0,1% Tween20 + 1% BSA in PBS). Die weiteren Inkubationsschritte wurden nun auf einem Orbitalschüttler bei 150 rpm durchgeführt und durch drei Waschschrte unterbrochen. Das Volumen der eingesetzten Lösungen betrug 100 µl/Loch. Die Proben wurden, wenn notwendig in PBS/1%BSA verdünnt, ansonsten unverdünnt, neben einem VEGF-A Standard (in PBS + 1%BSA + 0,05% Tween20) eingesetzt und sofort 50µl/Loch Biotinkonjugat (anti-VEGF-A-Antikörper, K2668, antigen-affinitäts gereinigt; 1:100 verdünnt in PBS + 0,5% BSA + 0,05% Tween20) zugegeben. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation für 1h mit Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (1:10.000 verdünnt in PBS + 0,5% BSA + 0,05% Tween20). Nach Zugabe von TMB-Substrat und Abstoppen der Reaktion mit 50 µl/Loch 0,5M H₂SO₄ wurde die Absorption bei 450 nm und 620 nm (als Referenz) gemessen.

3.6 Der spezifische quantitative Proteinnachweis von bioaktivem VEGF-A im RELIDA

Zur Charakterisierung der Affinität des anti-Flt-1 Antikörpers KM1750 zu sFlt-1 wurde ein RELIDA (Receptor-Ligand-Detection-Assay, Hornig et al. 2000) angewendet. Bei diesem Test wurden ELISA-Platten mit dem Rezeptor sFlt-1 beschichtet (1µg/mL, 50µL/Loch) und 1h bei 37°C inkubiert. Nach der Blockierung (PBS + 1%FCS, 200µL/Loch) über Nacht wurden die Platten gewaschen (PBS + 0,05% Tween20, 300µL/Loch), und der Antikörper (Verdünnungsreihe 10-0,1µg/mL in PBS + 1%FCS, 50µL/Loch) sowie VEGF-A (10ng/mL in PBS + 1%FCS, 50µL/Loch) zugegeben. Ligand und Antikörper konkurrierten so um die Bindestelle am Rezeptor. Die Menge an gebundenem VEGF-A wurde dann über ligandenspezifische Antikörper (anti-VEGF-A-Biotin (2668) 1:500 in PBS + 1%FCS, 100µL/Loch, 1,5h bei Raumtemperatur) und nachfolgendem Streptavidin-Enzym (Streptavidin-Poly-POD, 1:5000 in PBS + 1%FCS, 100µL/Loch, 1h bei Raumtemperatur) nachgewiesen, und durch Substratlösung (TMB, 100µL/Loch) detektiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion (0,25M H₂SO₄, 50µL/Loch) erfolgte die photometrische Detektion bei 450/ 620nm. So konnte die Affinität des KM1750-Antikörpers zu sFlt-1 im Vergleich zum Liganden VEGF-A bestimmt werden. Im Diagramm wurde die 10µg/mL Antikörper-Verdünnungsstufe gezeigt (IV 3.2.7).

3.7 Die Herstellung von Gewebelysaten

Zur Herstellung von Gewebelysaten wurde Gewebe im gefrorenen Zustand entnommen, ein ca.100mg Stück auf Trockeneis separiert, und in 1mL RIPA-Puffer (0,1% SDS; 1% Triton X100; 0,5% Na-Deoxycholat, Protease-Inhibitormix (Complete Protease Inhibitor Cocktail tablets, Fa.Roche Applied Science, Basel, Schweiz) mit Hilfe eines Dispergierstabes (UltraTurrax, Fa.IKA-Werke GmbH, Staufen) zerkleinert. Die Zelltrümmer wurden dann bei 4°C und 4000rpm für 10min abgetrennt, und das proteinhaltige Lysat bei -70°C aufbewahrt. Um die Konzentration eines Proteins im Lysat festzustellen, wurde der Gesamtproteingehalt jedes Lysates über den BCA-Assay (III 3.1) ermittelt, die spezifische Proteinkonzentration durch ELISA-Messungen (III 3.5) bestimmt, und dann die Endkonzentration pro mg Gesamtprotein ermittelt.

3.8 Die Depletion von murinem sFlt-1 aus Plasma

Zur Depletion von murinem sFlt-1 aus dem Plasma (IV 3.4) erfolgte als erstes die Herstellung von Sepharose-Säulen nach einer Methode der Fa. Pharmacia Bioscience/ Amersham Bioscience. Kleine Leersäulen wurden mit 0,5mL NHS-aktivierter Sepharose gefüllt und anschließend mit 1mM Isopropanol ausgewaschen (3x 0,5mL für 10,5mL Säulenvolumen, 0,5Tropfen/Min). Die Säulen wurden daraufhin wieder verschlossen, die äquilibrierte Ligandlösung darauf gegeben und bei Raumtemperatur 15-30min inkubiert. An das Säulenmaterial wurde zum Einen rekombinantes VEGF-A₁₆₄, und zum Anderen der Flt-1 Antikörper KM1750 gekoppelt. Im Vorfeld wurden diese Proteine über PD-10 Säulen oder Nap5-Säulen entsalzt, und danach zunächst in Kopplungspuffer (0,2M NHCO₃, 0,5M NaCl, pH8,3; 500µg Ligand auf 100µL) gelöst. Danach wurden die Säulen mit Puffer A (0,5M Ethanolamin, 0,5M NaCl, pH8,3) und Puffer B (0,1M Azetat, 0,5M NaCl, pH4) gewaschen. Für den Waschvorgang erfolgte jeweils ein dreimaliger Durchlauf à 1mL. Dabei wurde zuerst mit PufferA, Puffer B und wieder Puffer A gewaschen, die Säulen 15-30min stehen gelassen und dann noch einmal mit Puffer B, Puffer A und Puffer B gewaschen. Zum Schluß wurde die Säulen mit 1mL PBS gespült. Da nur geringe Mengen an Plasma vorlagen, wurden 100µL beladenes Säulenmaterial in eine gelbe Pipettenspitze gefüllt, und 100µL Plasma aus Ad sFlt-1 behandelten Tieren darüber gegeben. Der sFlt-1 Gehalt vor und nach dem Durchlauf der Säule wurde bestimmt. Nach der Analyse wurde das Säulenmaterial mit Lagerpuffer (0,05M Na₂HPO₄; 0,1% NaN₃; pH7) gespült und in diesem aufbewahrt.

4. Zellkultur

4.1 Die Kultivierung von 293HEK-Zellen

Zur Vermehrung von Adenoviren wurde eine adhärent wachsende humane embryonale Nierenzelllinie in niedriger Passagenzahl (293LP) eingesetzt (American Type Cell Collection, ATCC-Nr.: CRL 1573). Diese Zelllinie enthält Teile des Genoms des Adenovirus Typ5, so dass der hier verwendete replikationsdefiziente Adenovirusstamm nach Infektion dieser Zellen in der Lage ist sich zu replizieren (Louis et al. 1997). Zur Kultivierung dieser Zellen wurde das Vollmedium MEM (Minimal Essential Medium (Fa.Gibco BRL) + 10mM HEPES, 10mM NaHCO₃, 1mM Glutamin, 50mg/mL Penicillin/ Streptomycin) mit 10%FCS eingesetzt. Das FCS (fötales Kälberserum) wurde vor Zugabe des Mediums bei 56°C für 45min im Wasserbad inaktiviert, und bei 4°C gelagert (Fa. Biowest). Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen geerntet

und im Flächenverhältnis 1:4 – 1:8 umgesetzt (passagiert). Dazu wurde das alte Medium abgezogen, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit ca. $20\mu\text{L}/\text{cm}^2$ Trypsin-EDTA-Mischung (10x Trypsin/EDTA, Fa. PAA, 1:10 in PBS) abgelöst. Um den Vorgang zu beschleunigen, wurde das Ablösen durch Abschlagen unterstützt. Anschließend wurden die Zellen im gewünschten Volumen des Mediums aufgenommen und in neue Zellkulturflaschen überführt. Das enthaltene FCS inaktivierte dabei das Trypsin. Durch leichtes Schwenken wurde eine gleichmäßige Verteilung der Zellen gewährleistet, und die Zellen dann bei 37°C und $5\%\text{CO}_2$ inkubiert.

4.2 Die Kultivierung von A549-Zellen

Zum Nachweis adenoviral exprimierter Proteine wurde die adhärente humane Lungenkarzinomzelllinie A549 eingesetzt (ATCC-Nr.: CCL 185). Rekombinante replikationsdefiziente Adenoviren können sich nach Infektion dieser Zellen nicht vermehren, so dass nach Infektion das adenoviral eingebrachte exogene Protein recht lang exprimiert wird. Zur Kultivierung dieser Zellen wurde das Vollmedium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Fa.Sigma) + 10mM HEPES, 10mM NaHCO_3 , 1mM Glutamin, 50mg/mL Penicillin/ Streptomycin) mit 10%FCS eingesetzt. Das Passagieren dieser Zellen erfolgte in einem Flächenverhältnis von 1:10. Das Ernten, der Mediumwechsel und die Inkubation wurden analog der 293HEK-Zellen durchgeführt. Exprimiertes sekretiertes exogenes Protein konnte dann bereits 2d nach adenoviraler Infektion im serumfreien Kulturüberstand bestimmt werden. Zur Durchführung von Expressions-Assays wurde die Zellzahl/Loch nach dem Aussäen der Zellen bestimmt, und die Viruskonzentration für die entsprechend geplante MOI (multiplicity of infection = Viren/ Zelle) unmittelbar vor dem Experiment berechnet.

4.3 Die Kryokonservierung und das Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden am Ende der logarithmischen Wachstumsphase geerntet und sofort in eisgekühltem Einfriermedium (Vollmedium + 10% steriles DMSO) aufgenommen. Die Konzentration je mL entsprach dabei einem Zellrasen von 25cm^2 . Danach wurden die Zellen zu je 1mL/ Röhrchen aliquotiert, in einen mit Isopropanol gefüllten Einfriercontainer (Fa. Nalgene) über Nacht bei -70°C gefroren, und am nächsten Tag in flüssigem Stickstoff eingelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen im Röhrchen unter leichtem Schütteln im 37°C Wasserbad angetaut, in 10mL Vollmedium (37°C) überführt, bei 300g für 5min pelletiert, in 5mL

frischem Vollmedium aufgenommen, schließlich in einer mittleren Zellkulturflasche (75cm², Fa. Nunclon) ausgesät und bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert.

5. Adenovirusherstellung

Ein kleines Aliquot der im Tiermodell eingesetzten rekombinanten Adenoviren wurde freundlicherweise von Dr. Werner Lindenmaier, Braunschweig (AdVEGF-A₁₆₅ieG), und Dr. Gerhard Christofori, Basel (AdmsFlt1mFc) zur Verfügung gestellt. Die Vermehrung der Adenoviren erfolgte über eine Wirtszelllinie, das Nierenzellkarzinom HEK293. Diese Zellen wurden bereits im Abschnitt III 4.1 näher beschrieben.

5.1 Anreicherung von Adenoviren

Um eine ausreichende Menge aktiver viraler Partikel zu erhalten wurden als erstes Viruslysate aus einer geringen Menge von 293HEK Zellen hergestellt. Mit diesen Viruslysaten erfolgte dann die Infektion der Großproduktion.

Für die folgenden Schritte der Lysatherstellung, Virusernte, Virus-Großproduktion und Virusaufreinigung wurde eine Zentrifuge mit ausschwenkbaren Bechern verwendet, sowie eine Ultrazentrifuge mit Festwinkelrotor für die Herstellung des Gradienten bei der Virusaufreinigung. Um eine gute adenovirale Infektion der Zellen und den Zellerhalt zu gewährleisten, erfolgte die Kultivierung nach Infektion mit einem vermindertem FCS-Gehalt des Mediums von 5%.

Herstellung der Lysate

293HEK Zellen einer 300cm² Flasche mit einer Konfluenz von 90% und einer Passage von maximal 37 wurden mit 10mL PBS (137mM NaCl, 2mM KCl, 8mM Na₂HPO₄xH₂O, 1,47mM KH₂PO₄, pH7) gewaschen. Um eine intensive Infektion zu gewährleisten wurde als erstes eine Verdünnung aus 8mL PBS++ 2%FCS (PBS + 150mM CaCl₂x2H₂O, 200mM MgCl₂x6H₂O + 2%FCS) und 8µL reinem Adenovirus auf die Zellen gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schwenker bei 6 – 9rpm inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe des Mediums MEM 5%FCS (III 4.1) und die Inkubation der infizierten Zellen im Virusbrutschrank bei 37°C. Das Medium enthielt 5% weniger Serum als das Wachstumsmedium um den Infektionsprozess nicht zu hemmen. Die Zellen wurden täglich mit Hilfe des Lichtmikroskops auf zytopathische Effekte hin kontrolliert. Bei den

bicistronischen Konstrukten wurde zusätzlich die Expression von grün-fluoreszierendem Protein am Fluoreszenzmikroskop überprüft.

Sobald die Zellen einen deutlichen zytopathischen Effekt zeigten wurden sie geerntet. Dabei wurden die Zellen durch Schlagen oder Schaben mit dem Zellschaber vom Boden gelöst, Medium und Zellen bei 300g für 10min sedimentiert, und das Zellsediment in 10mL PBS++ vorsichtig resuspendiert. Der Aufschluss der virushaltigen Zellen erfolgte mechanisch durch dreimaliges Einfrieren bei -80°C und Auftauen im 37°C Wasserbad (FTL = Frier-Tau-Lysat). Während des Auftauvorgangs wurde das Röhrchen mit den halbgefrorenen Zellen über einen Röhrchenständer gezogen und so gemischt, um einen guten mechanischen Aufschluss der Zellen zu erreichen.

Dieses erste Lysat, das FTL, wurde jetzt genutzt um fünf weitere Lysate, die Prä-FTLs, aus 300cm²-Flaschen herzustellen, und so die Konzentration viraler Partikel für die Virusgroßproduktion zu erhöhen. Dafür wurde das FTL bei 300g für 10min sedimentiert, der Überstand mit PBS2% FCS auf 40mL aufgefüllt und mit dieser Verdünnung die fünf Flaschen mit je 8mL Virusverdünnung infiziert. Die Ernte und der mechanische Aufschluss der Prä-FTLs erfolgte wie beim ersten Lysat beschrieben.

Infektion der Virus Großproduktion

Zur Infektion einer Großproduktion wurde ein Prä-FTL bei 300g für 10min sedimentiert, der Überstand mit PBS2% FCS auf 160mL aufgefüllt und diese Verdünnung genutzt um zwanzig 300-cm² große Flaschen mit je 8mL Virusverdünnung zu infizieren. Das Medium wurde aus den Flaschen abgezogen, die Zellen vorsichtig mit der Virusverdünnung überschichtet und eine Stunde bei Raumtemperatur und 6-9rpm geschwenkt. Nach dieser Inkubationszeit wurden 72mL MEM 5%FCS (II 4.1) Medium je Flasche vorsichtig zugegeben, und die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Die Zellen wurden geerntet, nachdem sie einen deutlichen zytopathischen Effekt zeigten.

Zur Ernte wurden die Zellen durch Schlagen und Schaben vom Flaschenboden gelöst, Medium und Zellen gesammelt, und bei 300g für 10min bei 4°C voneinander getrennt. Um störende Mediumreste für den späteren enzymatischen Aufschluß der Zellen zu entfernen, erfolgte anschließend eine gründliche Reinigung der Zellen durch viermaliges Waschen mit eiskaltem Waschpuffer (=WP: 0,1M TRIS-HCl pH8.0). Dafür wurden die sedimentierten Zellen zunächst in 32mL WP resuspendiert, und bei 300g für 10min bei 4°C sedimentiert. Dieser Waschschrift wiederholte sich vier Mal, wobei sich bei jedem weiteren Waschschrift die Anzahl der Gefäße auf die Hälfte reduzierte. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt

wurde der restliche WP verworfen, und das Zellpellet mit Hilfe einer Pipette auf ein Volumen von 2,5mL hin überprüft, um so die Menge des zum Aufschluß nötigen Enzyms festzulegen. Die gewaschenen, aufkonzentrierten Zellen konnten dann in Form eines Pellet für kurze Zeit bei -20°C aufbewahrt werden.

5.2 Die Aufreinigung von Adenoviren

Um stabile Viruslösungen mit hoher Reinheit und hohem Titer zu erhalten, wurden die Adenoviruspartikel im CsCl-Dichtegradienten von zellulären Bestandteilen aus der Herstellung (III 5.1) getrennt und konzentriert. Das eingefrorene Virussediment wurde im 37°C warmen Wasserbad unter leichtem Schwenken aufgetaut. Durch Versetzen des Sedimentes mit 1/10 Volumen einer 5%igen Natrium-Desoxycholatlösung (5% Na-Deoxycholat in Wasser) und Inkubation für 30min auf Eis erfolgte der chemische Aufschluß der Zellmembran. Mit Hilfe des Enzyms Benzonase (30unit auf das Zellpellet von 10x 300cm²-Flaschen, Benzon-Nuclease, 10.000u/mL, Fa. Merck), und regelmäßigem Drehen des Röhrchens bei Raumtemperatur wurde die DNS aus den Zellen degradiert. Der Vorgang galt als abgeschlossen sobald das Virussediment nach ca. 60 – 90min vom flüssigen in den viskösen Zustand übergegangen war. Die Abtrennung der Zellreste erfolgte durch Zentrifugation bei 460g für 10min bei 4°C. Der resultierende Überstand wurde vorsichtig abgezogen und für die Gradientenzentrifugation vorbereitet. Der Überstand wurde mit AdV-Tris (Adenoviren-TRIS: 0,1M TRIS-HCl pH8) auf ein Volumen von 3,1mL eingestellt und mit 1,8mL, bei Raumtemperatur gesättigter, CsCl-Lösung (gesättigtes CsCl in 0,01M TRIS-HCl pH8, 0,001M EDTA) versetzt. Die Virussuspension/CsCl-Lösung (AdV-Tris, gesättigtes CsCl, im Verhältnis 3,1:1,8) austariert. Die Ultrazentrifugenröhrchen (Fa. Beckman) wurden mit dem Schweißgerät verschlossen, und in der Ultrazentrifuge (TL 100, DuPont) bei 47.000rpm für 20h bei 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation waren eine Virusbande in der Suspension, ein DNS-Pellet am Boden und ein Protein-Pellet am Deckel erkennbar. Die Virusbande wurde mit einer G23-Kanüle (BD Biosciences) abgezogen, in ein 1,5mL-Eppendorfgefäß überführt und das Volumen bestimmt. Die Lösung wurde mit AdV-Tris/ges.CsCl-Lösung (AdV-Tris:gesättigtem CsCl im Verhältnis; 3,1:1,8) auf ein Endvolumen von 5,1mL aufgefüllt. Nach der zweiten Zentrifugation wurde die Virusbande abgezogen und mit der Virusbande einer zweiten und gegebenenfalls dritten Virusbande einer Großinfektion vereint, um so einen ausreichend hohen Virustiter für *in-vivo* Experimente zu schaffen. Für die Herstellung eines Virusstocks des AdmsFlt-1mFc-Virus wurden demnach drei Virus-Großproduktionen vereint, und für die Herstellung der AdVEGF-A₁₆₅-eGFP- und Ad-eGFP-

Viren je zwei Virus-Großproduktionen. Die Virussuspension wurde erneut mit Tris/CsCl-Lösung (AdV-Tris:gesättigtem CsCl im Verhältnis 3,1:1,8) auf ein Endvolumen von 5,1mL aufgefüllt. Nach der dritten Zentrifugation wurde die resultierende Virusbande abgezogen und das Volumen des CsCl-gereinigten Adenovirusstocks vor dem Umpuffern bestimmt.

Umpuffern der Adenoviren

Da Cäsiumchlorid in der verwendeten Molarität ab einem Volumen von 60µL einen letalen Effekt bei Mäusen zeigte (eigene Erfahrungen), wurde die Adenoviren in ein anderes Medium überführt. Das geschah mittels Chromatographiesäulen zur Umpufferung von Proteinen („ZebaTM Desalt Spin Columns, 5mL “; Fa. Pierce). Dafür wurde als erstes die konservierende Lösung aus dem Säulenmaterial entfernt, durch einen Zentrifugationsschritt von 1000g für 2min bei Raumtemperatur. Als nächstes erfolgte die Äquilibration der Säule mit dem neuen Viruspuffer (20mM Tris-HCl pH8; 2,5% Glycerin; 25mM NaCl). Die Säule wurde mit 2,5mL des Puffers beladen und bei 1000g für 2min zentrifugiert. Dieser Äquilibrationsschritt wurde dreimal wiederholt. Danach wurde die Säule in ein frisches 15mL-Röhrchen überführt, die Virus-CsCl-Suspension durch vorsichtiges Tropfen auf die Säule geladen, 1min inkubiert und anschließend erneut bei 1000g für 2min zentrifugiert. Der Durchfluß enthielt nun die Adenoviren im Viruspuffer, deren Titer jetzt bestimmt werden konnte.

5.3 Die Titerbestimmung von Adenoviren

Da adenovirale Konstrukte mit GFP und ohne GFP in dieser Arbeit zur Anwendung kamen, wurden zwei Methoden der Titerbestimmung durchgeführt. Beide Methoden basieren auf der seriellen Verdünnung des Virus nach einem Protokoll von Dr. Werner Lindenmaier (HZI Braunschweig). Es wurden für beide Methoden 293HEK Zellen der niedrigen Passage (293LP) eingesetzt, die Passage 37 nicht überschritten. Das Ergebnis wurde in „plaque forming units/mL“ (pfu/mL) angegeben.

Die Titerbestimmung der **GFP-haltigen** AdVEGF-A₁₆₅-eGFP- und Ad-eGFP-Viren erfolgte über einen Zeitraum von 2 Wochen. Es wurden 96-Lochplatten mit Flachboden (Nunc, 12 Spalten, 8 Reihen) eingesetzt, der Assay erfolgte als 8-fach Bestimmung. Die Zellen wurden infiziert sobald sie konfluent waren. Bei einem erwarteten Titer $> 2 \times 10^9$ pfu/mL wurde zunächst, in zwei Verdünnungsschritten, eine 1:15.625 (2x 1:125) Verdünnung der Adenoviren in PBS/2%FCS angesetzt und daraus, in einer separaten 96-Loch Platte, eine 1:5 Verdünnungsreihe erstellt. Dazu wurde in alle Löcher 120µL PBS/2%FCS vorgelegt und in

die 8 Löcher der ersten Spalte je 30µL der 1:15.625 ($6,4 \times 10^{-5}$)-Virusverdünnung gegeben, dort dreimal mit 100µL Aufzugsvolumen gemischt und je 30µL dieser Verdünnung in die 8 Löcher der zweiten Spalte gegeben. Dieses Schema wurde bis zur elften Spalte wiederholt, die zwölfte Spalte blieb virusfrei, und diente als Negativkontrolle (=MOC). Nach Fertigstellung der Verdünnungsreihe wurden die 293LP Zellen mit je 40µL der entsprechenden Virusverdünnung infiziert, eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schwenktisch inkubiert, vorsichtig 160µL cMEM 5%FCS pro Loch zugegeben und die Zellen für 14d im Brutschrank bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Infektionseffizienz mit dem Fluoreszenzmikroskop spaltenweise, beginnend bei der $1,28 \times 10^{-5}$ Verdünnung, überprüft und jedes Loch mit eindeutigen GFP-positiven Plaques in einem Auswerteschema markiert. Vereinzelte GFP-positive Zellen wurden nicht gewertet. Es wurden mindestens so viele Löcher ausgewertet, bis die zwei folgenden Verdünnungsstufen in allen 8 Reihen negativ waren. Alle MOC-Kontrollen mussten negativ sein. Die entsprechenden Werte wurden in die folgende Formel nach Spearman und Kaerber eingefügt (Hamilton et al. 1977):

$$\log_{10} \text{TCD}_{50}\text{-Endpunkt-Titer} = x_0 - d/2 + d \Sigma (r/n) \quad \text{bzw.}$$

$$\text{TCD}_{50}\text{-Endpunkt-Titer} = 10^{x_0 - d/2 + \Sigma (r/n)}$$

TCD: tissue culture dose

x₀ : log₁₀ des Kehrwertes der höchsten Verdünnung, bei der alle Löcher einer Spalte noch Plaques aufweisen. Bsp.: letzte Verdünnungsstufe in der noch alle Löcher Plaques aufweisen ist Spalte vier → Verdünnung $1,02 \times 10^{-07}$ → log₁₀ des Kehrwertes: 6,99=x₀

d: log₁₀ des Verdünnungsfaktors; bei 1:5 Verdünnungen : log₁₀5 = 0,699

r: Anzahl der Löcher pro Verdünnungsschritt, die Plaques aufweisen → letzte vollständig positive Spalte (8) + alle zusätzlich positiven Löcher in höheren Verdünnungsstufen

n: Anzahl der Löcher pro Verdünnungsschritt (hier n = 8)

Mit Hilfe dieser Formel lässt sich, unter Berücksichtigung des eingesetzten Infektionsvolumens und der Festlegung, dass ein TCD50 = 0,7 pfu entspricht, der Titer berechnen:

$$\text{Virus-Titer [pfu/mL]} = (\text{TCD}_{50} \times 1\text{mL} / 0,04\text{mL}) \times 0,7$$

Die Titerbestimmung des **GFP-freien** AdmsFlt1mFc-Konstruktes erfolgte als Doppelbestimmung und dauerte 3 Wochen. Hierfür wurden 293HEK-Zellen (< Passage 37) in 24-Loch-Flachbodenschalen ausgesät, und infiziert sobald sie konfluent waren. Die Virusverdünnungen wurden in separaten 24-Lochschalen als absteigende Verdünnungsreihe, von 10^{-3} bis 10^{-14} , hergestellt, so dass für die Doppelbestimmung und die Negativkontrolle mindestens zwei 24-Lochschalen verwendet wurden. In zwei 24-Lochplatten wurden in das erste Loch jeder Reihe 990µL PBS 2%FCS vorgelegt, in alle weiteren Löcher je 900µL. Vom aufgereinigten Virus wurde eine 1:10 Verdünnung (5µL Virus + 45µL PBS/2%FCS) hergestellt und gut durchmischt. Von dieser Verdünnung wurden 10µL zu den vorgelegten 990µL PBS/2%FCS in das erste Loch der ersten zwei Reihen pipettiert und erneut gut gemischt. Mit einer jeweils frischen Spitze wurden von den nun insgesamt 1.000µL genau 100µL in das nächste Loch überführt und wieder durchmischt. So wurde weiter verfahren bis zum letzten Verdünnungsschritt von 10^{-14} . Die letzten zwei Reihen dienten als Negativkontrolle (MOC). Die Verdünnungen konnten bei Bedarf über Nacht bei 4°C aufbewahrt werden, sollten aber bei der Infektion Raumtemperatur haben. Nach der Fertigstellung der Verdünnungsreihen folgte die Infektion der konfluenten Zellen. Die Verdünnungen wurden bei 10^{-14} beginnend nochmals gut durchmischt. Von den Zellen wurde das Medium abgenommen, und je 200µL/Loch an Virusverdünnung in das korrespondierende Loch der 293HEK-Platte übertragen, beginnend mit der Verdünnungsstufe 10^{-14} . Die Infektion wurde 1h bei Raumtemperatur auf einem Schwenktisch (6-9rpm) inkubiert und die Zellen anschließend vorsichtig mit je 1mL MEM 5%FCS supplementiert. Die Platten wurden dann 3 Wochen bei 37°C inkubiert, und der Zellrasen täglich auf die Bildung von Plaques hin überprüft. Die Anzahl der Plaques wurde dabei festgehalten. Die Verdünnungsstufe deren Anzahl an Plaques sich über 2-3d nicht erhöhte wurde zur Auswertung herangezogen und das Ergebnis in „plaque forming units“ (pfu) angegeben. Folgende Formel kam zur Anwendung: Titer [pfu/mL] = Anzahl der plaques/ (Verdünnungsstufe x Volumen an Viruslösung [mL]).

5.4 Der Nachweis des adenoviral überexprimierten Proteins

Zum Nachweis des adenoviral überexprimierten Proteins wurden A549-Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät, und nach vollständiger Konfluenz mit einer 1:1.000 Verdünnung des entsprechenden aufgereinigten Adenovirus in 0,5mL PBS 2%FCS infiziert. Nach der einstündigen Inkubation der Zellen mit der Viruslösung erfolgte die Zugabe von 4,5mL FCS-freiem DMEM. Die Zellen wurden dann 2-3d bei 37°C inkubiert, bis ein zytopathischer Effekt durch Abrunden und Ablösen der Zellen, bzw. die grüne Fluoreszenz bei GFP-haltigen

Konstrukten, eintrat. Das Medium wurde daraufhin abgenommen und als Probe für den Proteinnachweis im Western-Blot oder ELISA verwendet.

Um intrazelluläres Protein in Zellysaten nachzuweisen, wurden die verbleibenden Zellen mit 1mL RIPA-Puffer (III 3.7) überschichtet, und der chemische Zellaufbruch durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren beschleunigt. Die Zellysate wurden dann ebenfalls wie die Zellüberstände bei -20°C aufbewahrt.

6. Das Mausmodell

Für das Mausmodell wurden Mäuse des Stammes Balb/c eingesetzt (Fa. Harlan, Indianapolis, USA). Diese Tiere weisen ein relativ großes Nierengewicht im Vergleich zu anderen Stämmen auf, und eignen sich daher gut für das hier etablierte Mausmodell, in dem erste Effekte der Behandlung an histologischen Veränderungen der Niere abgelesen wurden (Schlager et al. 1968). Die funktionellen Einheiten der Niere, die Glomeruli, rekonvaleszieren nach Schädigung sehr schnell in der nicht adulten Maus (Prof. Dr. A.D. Gruber, pers. Mitteilung). Um die Effekte der Behandlung nachweisen zu können wurden deshalb adulte Tiere in einem Alter von 12-16 Wochen eingesetzt. Abhängig von der experimentellen Planung wurden den Tieren zwischen 1×10^8 pfu und $7,5 \times 10^9$ pfu rekombinante Adenoviren am Tag 1 des 10-tägigen Experimentes intravenös in eine der vier Schwanzvenen appliziert. Die Verdünnung der Adenoviren erfolgte direkt vor der Applikation. Die Tiere wurden während des Versuchs auf ihren guten gesundheitlichen Zustand hin beobachtet, und die adenoviral infizierten getrennt von den nicht infizierten Kontrolltieren gehalten. Tiere in schlechter gesundheitlicher Verfassung wurden vorzeitig mit CO₂ getötet. Die Tiere hatten freien Zugang zu sterilem Wasser und sterilen Futterpellets (0.25% Natrium; SNIFF Spezialitäten, Soest). Am Tag 10 des Experimentes wurde ein Teil der Tiere zur Sektion und Organentnahme durch Luxation zwischen dem 2. und 3. Halswirbel getötet, und der andere Teil zur Gewinnung von Sammel-Urin für 24h nochmals separat in einem Stoffwechselkäfig gehalten (Fa. Techniplast, Italien). Auch hier erhielten die Tiere freien Zugang zu Wasser und Futter. Die Tiere wurden zu Beginn und nach Ende des Experimentes gewogen, um einheitliche Gruppen zu gewährleisten, und den Einfluß der Behandlung zu überwachen. Nach dem Töten der Tiere durch Luxation zwischen dem 2. und 3. Halswirbel wurde postmortal Blut entnommen. Dafür wurde je 1,5mL-Röhrchen 200µL Heparin (0,15i.E./µL) vorgelegt und die Flüssigkeit einrotiert, so dass die getrockneten Heparinkristalle durch das Blut gelöst und ihre gerinnungshemmende Wirkung entfalten konnten (Heparin-Ampullen,

Fa. Ratiopharm, Ulm.). Das Blut wurde 20min bei 4.000rpm und 4°C abzentrifugiert, das Plasma abgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

Bei der Sektion wurden den Tieren die Leber, das Herz, die Lunge und die Nieren entnommen. Lunge und Herz wurden in PBS gespült um überschüssiges Blut zu entfernen. Der Leber wurde vorsichtig die Gallenblase entfernt. Leber, Herz und Nieren wurden gewogen. Der große Leberlappen sowie die rechte Niere wurde in 10% Formaldehyd pH 7,5 gelagert, und zur histologischen Begutachtung an den Mauspathologen Herrn Prof. Dr. A.D. Gruber an der FU Berlin weitergeleitet. Die restlichen Organe wurden unmittelbar nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren, und bei -80°C gelagert. Für die Durchführung elektronenmikroskopischer Aufnahme erfolgte die Gewebeaufbereitung gesondert. Die rechte Niere wurde lateral halbiert, und die eine Hälfte für Paraffinschnitte in 10% Formaldehyd pH7,5 gelagert. Aus der anderen Hälfte wurden aus der juxtaglomerulären Region mit Hilfe eines Mikroskops Würfel der durchschnittlichen Kantenlänge 1x1mm herausgetrennt, und in Fixativ nach Karnovsky (vgl. Ende des Kapitels) für 72h gelagert. Danach wurden sie in PBS überführt, und ebenfalls an den Mauspathologen zur feinhistologischen Analyse weitergeleitet.

Die gesammelten Plasmaproben wurden zur Konzentrationsbestimmung enthaltener zirkulierender Proteine und Depletionsversuchen genutzt. Aus Leber- und Nierengewebe wurden Lysate hergestellt, und ebenfalls die Konzentration an enthaltenem exogenem und endogenem Protein bestimmt. Herz und Lunge waren nicht Gegenstand der Untersuchungen in diesem Mausmodell.

Die Herstellung des **Fixativ nach Karnovsky** (7,5% Glutaraldehyd, 3% Paraformaldehyd) erfolgte zur Vorbereitung von Gewebestücken für die Elektronenmikroskopie. Folgende Lösungen wurden hergestellt und dann mit gleicher Temperatur zusammengegeben: 200mL Paraformaldehyd (30g Paraformaldehyd in 200mL 60°C-warmem H₂O lösen; mit 1M-NaOH titrieren bis Lösung aufklart; Lösung abkühlen auf Raumtemperatur), 300mL 0,2M-Cacodylatpuffer (42,81g Cacodylat-Na-salz in 1000mL H₂O lösen; pH-Wert mit HCl auf 7,4 einstellen; 500mg CaCl₂x2H₂O im Cacodylatpuffer lösen) und 300mL 25%-iges Glutaraldehyd (50% Glutaraldehyd mit H₂O verdünnen). Die Lösungen wurden zusammengegeben, mit konzentrierter HCl auf pH7,4 eingestellt und dann mit H₂O auf 1000mL aufgefüllt. Auftretende Schwebeteilchen wurden durch die Bindung an grobkörnige Aktivkohle aus der Lösung entfernt. Nach der Filtration durch einen doppelten Faltenfilter wurde das Fixativ aliquotiert und bei -20°C gelagert.

7. Statistik

Zur Auswertung der Ergebnisse aus den Tierversuchen wurde eine Statistik durchgeführt. Es wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen der jeweiligen Gruppen mit Hilfe der Software „Excel“ berechnet. Des Weiteren wurden die Gruppen miteinander verglichen und über den Student's T - Test die Wahrscheinlichkeit bestimmt, mit der die Gruppen signifikant verschieden ($P < 0,01$) oder lediglich wahrscheinlich verschieden ($P < 0,05$) sind.

IV. Ergebnisse

1. Entwicklung eines neutralisierenden einzelkettigen Antikörpers

1.1 Blockierende Antikörper

Als Ziel dieser Arbeit galt es den Zustand der Präeklampsie experimentell im Mausmodell zu simulieren. Präeklampsische Symptome sollten über adenovirale sFlt-1 Überexpression induziert, und der causale Zusammenhang durch die Neutralisierung der sFlt-1-Aktivität und damit verbundener Effekte verdeutlicht werden. Die Neutralisierung des Inhibitors kann durch Bindung an dessen co-exprimierten Liganden, oder aber durch einen Antikörper realisiert werden. Dieser Antikörper muß jedoch so binden, dass er eine sterische Veränderung der Ligandenbindestelle bewirkt, und somit blockierend hinsichtlich der sFlt-1-Aktivität agiert.

Versuche zur Entwicklung eines solchen Antikörpers waren ebenfalls Teil dieser Arbeit.

Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, einen Antikörper mit blockierenden Eigenschaften zu generieren, wird der Antikörper aus einer Immunbibliothek hergestellt, in Form eines einzelkettigen Antikörpers (single chain fragment variable - scFv). Dabei wird in einem ersten Schritt ein Tier mit dem Zielantigen immunisiert. Die immunologischen Organe wie Milz und Lymphknoten werden dann als Matrice genutzt, schwere und leichte Ketten bestehender Antikörper zu amplifizieren, aus denen dann der scFv kloniert werden kann.

Im Vergleich zu herkömmlichen Antikörpern weist der scFv verschiedene Vorteile auf. Mit 30kDa entspricht die Größe des scFv etwa dem Fünftel von IgM, dass den kleinsten Antikörper repräsentiert. Aufgrund dieser geringen Größe kann der scFv besser in Gewebe diffundieren, und auch durch Bakterien produziert werden, so dass der Prozess der Antikörperherstellung erheblich vereinfacht wird. Durch die separate Amplifikation und spätere Kombination verschiedener schwerer und leichter Ketten erhält die single-chain Bibliothek eine hohe Diversität.

Die Methode der Herstellung eines bioaktiven hochspezifischen scFv wurde bereits erfolgreich bei der Entwicklung eines anti-VEGFR-2 Antikörpers durch Böldicke et al. eingesetzt (Böldicke et al. 2001). Dieser Antikörper wurde ebenfalls aus einer Immunbibliothek generiert, und spezifische Klone über die Phage-Display Methode isoliert. Der finale Kandidat zeigte in BIACORE-Studien einen K_D von $3,8 \times 10^{-9} M$.

1.2 Immunisierung von Mäusen

Die Herstellung einer Immunbibliothek besteht aus mehreren Schritten. Nach der Immunisierung von Mäusen mit dem entsprechenden Antigen werden Lymphozyten und Milz entnommen, und diese Gewebe als Ausgang zur Amplifikation schwerer und leichter Ketten des späteren Antikörpers genutzt. Um herauszufinden welche dieser Antikörper tatsächlich funktional sind, wird über das Phage-Display-System die Antigenbindung getestet. Dafür werden die amplifizierten und fusionierten Gene schwerer und leichter Ketten der neuen Basis-Antikörper in einen Phagemid-Vektor (pCANTAB 5E) kloniert. Nach Transformation in *E.coli* TG1 und Infektion mit einem Helferphagen (M13K07) werden Phagenpartikel gebildet, die auf ihrer Oberfläche den neuen Antikörper als Fusionsprotein präsentieren. Phagen, die einen funktionalen Antikörper präsentieren können so selektiert und vermehrt werden. Die Infektion des *E.coli* HB2151 mit erfolgreich getesteten Kandidaten der Vorrunde ermöglicht die Produktion des einzelkettigen Antikörpers sowie seine Sekretion in das Plasma der Zelle und anschließend in das Medium. Aus dem Medium kann der Antikörper dann aufgereinigt werden.

Der potentielle Antikörper sollte folgende Charakteristika aufweisen: Er darf nicht an die Liganden VEGF oder PlGF, oder den Rezeptor VEGFR-2 (KDR) binden, und er muß eine hohe Affinität zu sFlt-1 aufweisen sowie die sFlt-1 Bindung von VEGF und PlGF durch sterische Konformationsänderung blockieren.

Zur Immunisierung wurden 4 – 6 Wochen alte Mäuse der Linie Balb/ c gewählt, die bekannt dafür sind gut auf eine Immunisierung anzusprechen. Je 10µg rekombinantes sFlt-1, dass aus den ersten fünf Domänen bestand, wurde in 50µL Freuds Adjuvans Complete aufgenommen, und über die Fußsohle in drei weibliche Mäuse appliziert. Die Auffrischung der Immunisierung erfolgte vierfach, an Tag 5, 9, 14 und 19 der Immunisierung mit Freuds Adjuvans Incomplete. Am 27. Tag wurden die Tiere getötet und die Lymphozyten von der Milz und den poplitealen Lymphknoten gesammelt. Blutproben wurden vor und nach der Immunisierung entnommen, um die Antikörperaktivität über ELISA-Messungen zu evaluieren. Die Ergebnisse sind in Abb.IV.1 dargestellt.

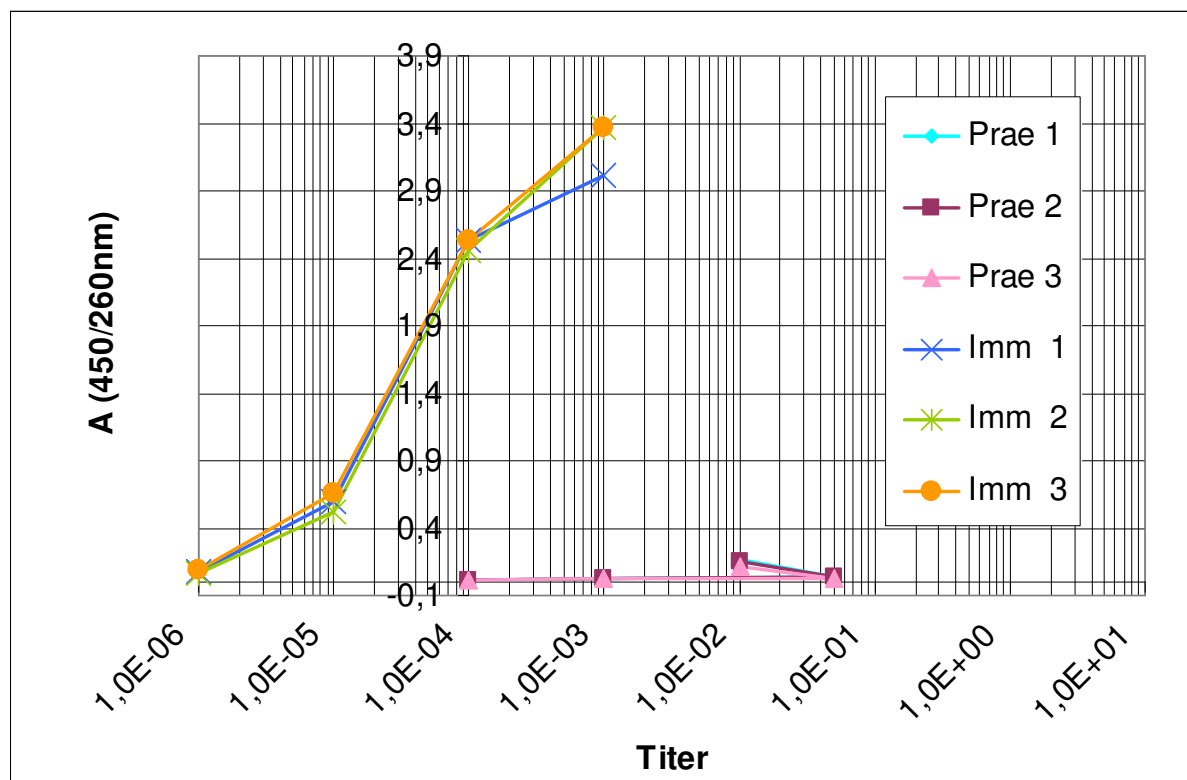


Abb. IV.1: Antikörperaktivität der Präimmun- und Immunsereen aus immunisierten Mäusen

Dargestellt ist die Antikörperaktivität im Serum von drei Mäusen vor der Immunisierung (Prae1, Prae2, Prae3) und nach der Immunisierung (Imm1, Imm2, Imm3). Die gemessene Optische Dichte wurde über der eingesetzten Verdünnung aufgetragen.

Da für die zu erwartende Antikörperaktivität keine Kontrolle zur Verfügung stand, ist die Aktivität der Seren als Optische Dichte über der Verdünnung aufgetragen. Als Positivkontrolle wurde der anti-Flt-1 Antikörper Klon FLT-19 eingesetzt.

So konnte in den Präimmunsereen in den Verdünnungen 1:100, 1:500, 1:1.000 und 1:10.000 durchschnittlich eine Aktivität von $0,14 \pm 0,026A$, $0,04 \pm 0,005A$, $0,03 \pm 0,003A$ und $0,02 \pm 0,004A$ detektiert werden, und in Immunsereen in den Verdünnungen 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000 und 1: 1 000.000 durchschnittlich eine Aktivität von $3,25 \pm 0,203A$, $2,51 \pm 0,047A$, $0,59 \pm 0,073A$ und $0,07 \pm 0,015A$ nachgewiesen werden. Der beispielgebende Vergleich zeigt, dass in den Präimmunsereen bei einer Verdünnung von 1:1.000 durchschnittlich ein Wert von $0,03 \pm 0,003A$ gemessen wurde, während der Wert der gleichen Verdünnung in Immunsereen um das 100fache höher, bei $3,25 \pm 0,203A$ lag. Es konnte also ein deutlich erhöhtes Signal der Immunsereen im Vergleich zu den Präimmunsereen als Antwort auf die sFlt-1 Antigenbindung nach der Immunisierung belegt werden (Abb. IV.1)

Diese Signale können als Zeichen für eine erfolgreiche Immunisierung, und damit als positives Votum für die Konstruktion der nativen Immunbibliothek gedeutet werden.

1.3 Herstellung des einzelkettigen Antikörpers (scFv)

Für die Entwicklung des Antikörpers wurde sowohl das „Recombinant Phage Antibody System“ (RPAS-System) der Firma Amersham Bioscience, als auch die Protokolle von McCafferty et al. angewandt (McCafferty et al. 1996). Aus Lymphozyten von jeweils Milz und Lymphknoten der immunisierten Mäuse wurde mRNA präpariert, und anschließend cDNA synthetisiert. Die schweren (VH) und leichten (VL) Ketten wurden über Primermischungen des RPAS-Systems, und Primersequenzen des McCafferty-Protokolls (Tab. III.1) amplifiziert (Abb. IV.2). Die Amplifikation von schweren und leichten Ketten nach McCafferty et al. erfolgte in fünf unterschiedlichen PCR-Reaktionen. Die schweren Ketten wurden durch Anwendung der Primer VH1BACK und VH1FOR-2 generiert. Die vier verbleibenden PCR-Reaktionen wurden zur Herstellung der leichten Kappa-Ketten genutzt. Dafür wurde der VK2BACK-Primer mit jeweils einem der vier verschiedenen Primer für die J-Region (MJK1FONX, MJK2FONX, MJK4FONX, MJK5FONX) kombiniert. Um die Diversität der Bibliothek zu erhöhen, wurden die Primermischungen für leichte und schwere Ketten des RPAS-Systems durch Kombination mit Primern aus dem Protokoll von McCafferty et al. komplementiert. Die Amplifikation der schweren Ketten erzielte ein PCR-Produkt von 345bp, und die der leichten Ketten ein PCR-Produkt von 325bp (Abb. IV.2B). Da die leichten Ketten von murinem IgG zu 95% aus Kappa-Ketten bestehen, wurde diese Familie der leichten Ketten zur spezifischen Amplifikation ausgewählt.

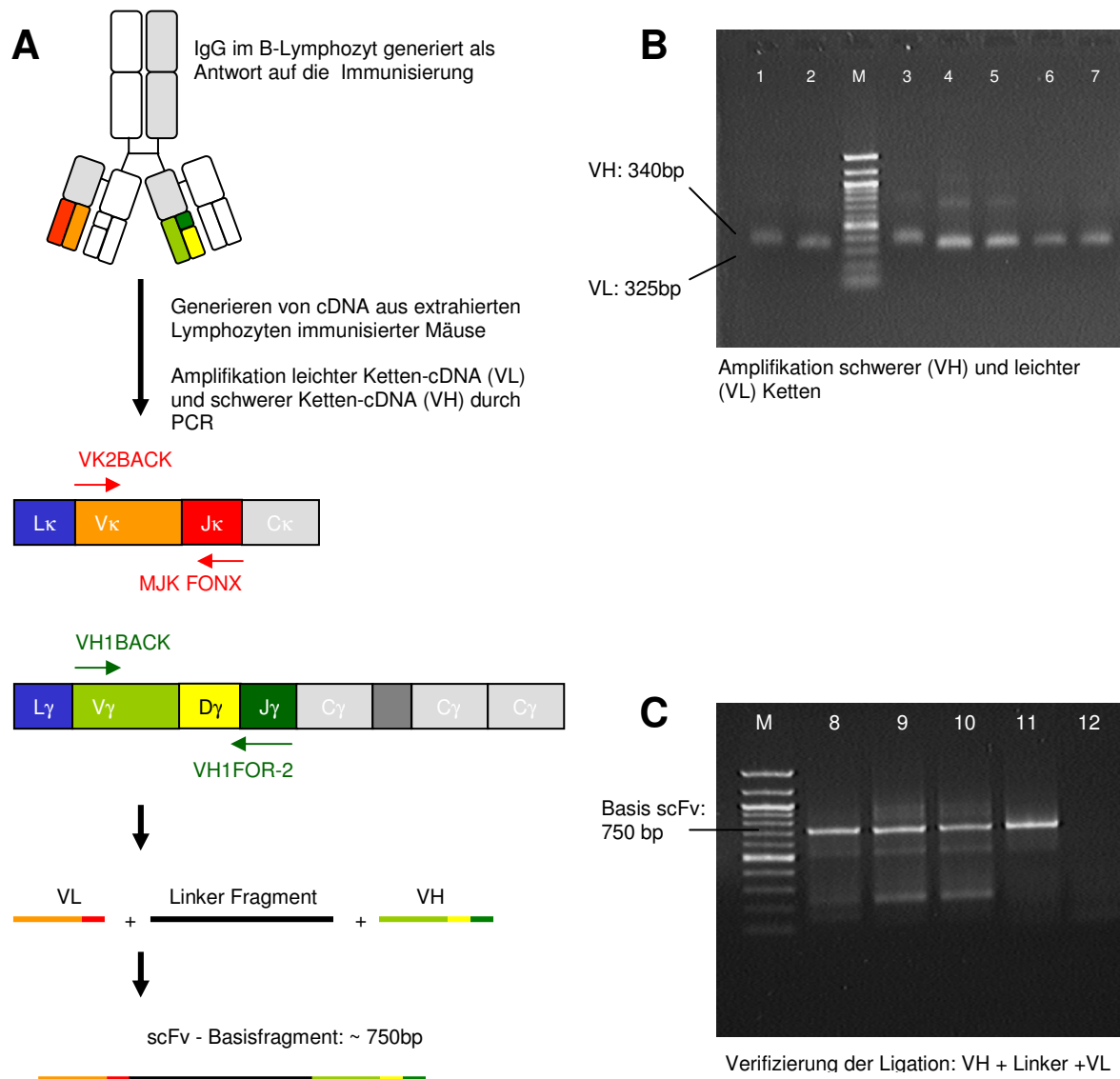


Abb. IV.2: Amplifizierung der schweren (VH) und leichten (VL) Ketten, und Fusion dieser zum scFv-Basiskonstrukt.

A) Antikörper von B-Lymphozyten wurden als Matrice zur Amplifikation spezifischer codierender Regionen genutzt. Die Bindestellen der Primer sind skizziert. Familie der leichten κ -Ketten: L κ -Leitsequenz, V κ -variable Region, J κ -verbindende („joining“) Region, C κ -konstante Region; Familie der schweren Ketten: Bezeichnung wie die der leichten Ketten jedoch zur Familie der γ -Ketten gehörend. Zusätzlich existiert eine D γ -Region für Diversität. **B)** PCR-Produkte der amplifizierten schweren und leichten Ketten, nachgewiesen durch Agarosegelelektrophorese: Spur 1 und 2 zeigt VH+VL generiert mittels RPAS-Primermischung, Spur 3 bis Spur 7 zeigt Primer des McCafferty Protokolls: Spur 3 zeigt VH, Spur 4,5,6 und 7 zeigt VL. **C)** scFv-Basisfragment (single chain fragment variable): Beispiele legierter Ketten. Spur 8 präsentiert Konstrukte generiert über das RPAS-System, Spur 9 bis 10 repräsentiert Konstrukte generiert mittels McCafferty Primer: Spur 9: VH+VL4, Spur 10: VH+VL5, Spur 11: Positivkontrolle (RPAS-Kit), Spur 12: Negativkontrolle (keine DNS).

Nach dem Generieren verschiedener schwerer und leichter Ketten wurden diese über ein 70bp langes Linker-Fragment miteinander verbunden. Auf diese Weise entstanden sieben unterschiedliche scFv-Basiskonstrukte (Abb. IV.2C). Über eine weitere PCR-Reaktion wurden Vektor-kompatible Restriktionsschnittstellen (SfiI, NotI) an die 5'- und 3'Enden der scFv-Basiskonstrukte angefügt. Da diese Schnittstellen selten in den Genen von Antikörpern zu finden sind, sollte so die Klonierung des scFv-Basiskonstruktes als einzelnes SfiI/ NotI-Fragment in den Phagemid-Vektor pCANTAB 5E ermöglicht werden. Nach dem sequentiellen Verdau des scFv-Basisfragmentes durch die Restriktionsendonukleasen SfiI und NotI wurden die Fragmente durch Agarosegelaufreinigung von verbleibenden Linker-Fragmenten, Primern und Enzymen abgetrennt, um einer Störung der Ligation vorzubeugen. Mittels der nun cohesiven Enden des scFv-Basisfragmentes konnte die Klonierung der scFv-DNS in den ebenfalls vorverdauten Expressions-Phagemid-Vektor pCANTAB 5E erfolgen. Beide Restriktionsseiten, SfiI und NotI, erlauben die richtige Orientierung des scFv-Basisfragmentes, und die „in-frame“ Klonierung mit dem Oberflächenprotein-codierenden Gen 3 zur Expression des scFv-g3p-Fusionsproteins. Der nun komplettierte Phagemid-Vektor wurde durch Elektroporation in *E.coli* TG1 transformiert. Klone, als Ergebnis der Transformation, wurden über einen SfiI/ NotI-Verdau auf das Vorhandensein des scFv-Basisfragmentes hin überprüft. Die Analyse durch Agarosegelelektrophorese bestätigte die Existenz eines 750bp-großen Fragmentes. Zur Kontrolle wurden ebenfalls Klone examiniert, die aus der Ligationsreaktion ohne scFv-Basisfragment stammten. Diese zeigten nach Restriktionsanalyse ebenfalls ein 750bp-großes Fragment. Daraufhin wurden Klone beider Reaktionen, scFv-Basisfragment und Kontrolle, sequenziert. Für die Sequenzierung wurden Primer aus dem RPAS-System eingesetzt, die zur Amplifizierung der schweren und leichten Ketten des sequenzierten Klons angewendet, als auch Primer die an der Linker-Region binden. Die Linker-Region konnte in Klonen beider Reaktionen nachgewiesen werden. Der Vergleich sequenzierter Klone des scFv-Basisfragmentes und der Kontrolligation ergab jeweils unterschiedliche Sequenzen die auch bei der Kontrolligation ausser der Linkersequenz keine Übereinstimmungen aufwiesen (Daten hier nicht gezeigt).

Zur Kontrolle wurde nun der vorverdaute Phagemidvektor pCANTAB 5E aus dem RPAS-System über Gelelektrophorese untersucht. Dafür wurde jeweils 1µL des unveränderten Vektors aus dem bereits genutzten Kit, als auch aus einem noch nicht verwendeten Kit aufgetragen. Beide Proben zeigten ein 4,5kb großes Vektor-Fragment, und ein weiteres 750bp großes Fragment. Dieses Ergebnis gibt einen Hinweis darauf, dass der Phagemid-Vektor pCANTAB 5E unzureichend aufgereinigt von der Firma bereitgestellt wurde. In einem

nächsten Schritt wurde nun der vorverdaute pCANTAB 5E gelgereinigt, um das unbekannte 750bp-Fragment zu entfernen. Anschließend war geplant, einen 1kb großen Platzhalter einzusetzen um so die Detektion des scFv-Basisfragmentes in positiven Klonen zu erleichtern.

An diesem Punkt des Projektes eröffneten sich zwei Möglichkeiten bezüglich des neutralisierenden Flt-1 Antikörpers:

- i) Das Projekt wird fortgeführt. Um das Projekt zu beenden sind noch etliche Schritte erforderlich, wie Komplettierung des Phagen durch Infektion mit dem Helferphagen, Durchführen des Panning, also der Bindungsstudien zur Detektion tatsächlich bindender, durch den Phagen exprimierter Antikörper, Anreicherung potentieller Kandidaten durch Reinfektion, Kontrolle selektierter Klone und Produktion der löslichen scFv mit anschließender Aufreinigung.
- ii) Das Projekt wird abgebrochen, und anstelle des noch zu generierenden Antikörpers wird der bereits zur Verfügung stehende blockierende Antikörper von Prof. Shibuya und von der Fa.BIOWA (Tokyo, Japan) im Mausmodell angewendet.

Aufgrund der umfangreichen Arbeiten, die zu diesem Projekt noch durchgeführt werden müssten, und der Beobachtungen bei der Examination von Klonen aus den Transformationsreaktionen, wurde entschieden diesen Projektabschnitt vorläufig zu beenden. Der Antikörper stellt ein Werkzeug dar, um das Thema der Dissertation umzusetzen. Das Thema der Arbeit ist jedoch die Etablierung des Mausmodells. Für die Neutralisierung wird nun der blockierende und bereits publizierte Flt-1 Antikörper von Prof. Shibuya eingesetzt.

Diese Entscheidung erlaubt das Fortführen der Untersuchungen zum Einfluß von sFlt-1 auf das Gleichgewicht pro- und antiangiogener Faktoren, und auf diese Weise die Optimierung des Mausmodells.

2. Produktion von rekombinanten Adenoviren

Für die Etablierung des Mausmodells sollte als erstes der präeklampsische Zustand in der Maus simuliert werden. Nach der Arbeitshypothese ist die Voraussetzung dafür eine sehr hohe Konzentration des löslichen VEGF-Rezeptors sFlt-1 in der Zirkulation des Versuchstieres. Die Überexpression von Proteinen im murinen Organismus wurde in dieser Arbeit durch adenoviralen Gentransfer realisiert. Neben rekombinanten Adenoviren für die Überexpression von murinem sFlt-1 (AdmsFlt-1mFc), wurden Adenoviren die das Gen für humanes VEGF-A₁₆₅ tragen (AdVEGF-A₁₆₅-eGFP), als auch Kontrolladenoviren, die lediglich das Gen für das Reporterprotein eGFP (enhanced green fluorescent protein) enthalten (Ad-eGFP) angewendet.

Die Produktion der Adenoviren nahm einen Großteil der Zeit dieser Dissertation in Anspruch. Die Art und Weise der Adenovirusherstellung wurde im Kapitel III, Material und Methoden, näher erläutert. Im Rahmen der Arbeit wurden verschiedene Präparationen der Adenoviren erstellt, die sich qualitativ unterschieden. Dieser Unterschied spiegelte sich später auch beim Einsatz im Mausmodell wieder. So musste der Titer einer Präparation für die *in-vivo* Anwendung im Mausmodell völlig neu bestimmt werden, da die *in-vitro* ermittelten Daten bei der Reproduktion stark voneinander abwichen. Ein Vergleich einzelner Präparation hinsichtlich der Proteinexpression und der Erzielung von Effekten *in-vivo* wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit im Ergebnisteil 3 beschrieben.

Die Adenoviren wurden bereits erfolgreich sowohl *in-vivo* als auch *in-vitro* genutzt (Compagni et al. 2000, Mayer et al. 2005). Vor der Anwendung im vorliegenden Tiermodell wurden sie nochmals *in-vitro* überprüft.

2.1 Mikroskopische Kontrolle der Funktionalität

Um die Funktionalität der frisch präparierten Adenoviren zu überprüfen, wurden Zellen einer humanen Lungenkarzinomzelllinie (A549) mit rekombinanten Adenoviren infiziert. Die Infektion der Zellen und die Expression der adenoviral kodierten Proteine konnten als erstes über Licht- und Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden. So konnte mittels Lichtmikroskopie der zytopathische Effekt gezeigt werden. Dabei lösen sich die Zellen als Folge adenoviralen Befalls 2 - 5 Tage nach Infektion ab, verlassen also ihre flache Struktur und gehen zu einer kugeligen Morphologie über. Die Expression von Proteinen kann über die Expression des Reporters GFP kontrolliert werden. Bei bi-cistronischen Konstrukten wird davon ausgegangen, dass die Transkription des an zweiter Stelle liegenden Gens die des ersten voraussetzt. So exprimieren grün fluoreszierende Zellen, die mit AdVEGF-A₁₆₅-eGFP infiziert wurden neben dem nach UV-Anregung sichtbaren GFP ebenfalls VEGF-A₁₆₅.

Zur Produktion von Adenoviren wird eine humane Nierenzellkarzinomlinie genutzt, die stabil mit der E1-Region des adenoviralem Genoms transfiziert ist. Die Infektion dieser Zellen durch die E1-defizienten Adenoviren ermöglicht die Replikation der Viren und somit deren Vermehrung.

Der Nachweis der GFP-Expression von infizierten Zellen bei den in dieser Arbeit angewandten bi- und monocistronischen Konstrukten sowie die morphologischen Veränderungen der infizierten Zellen sind in Abb. IV.3 dargestellt.

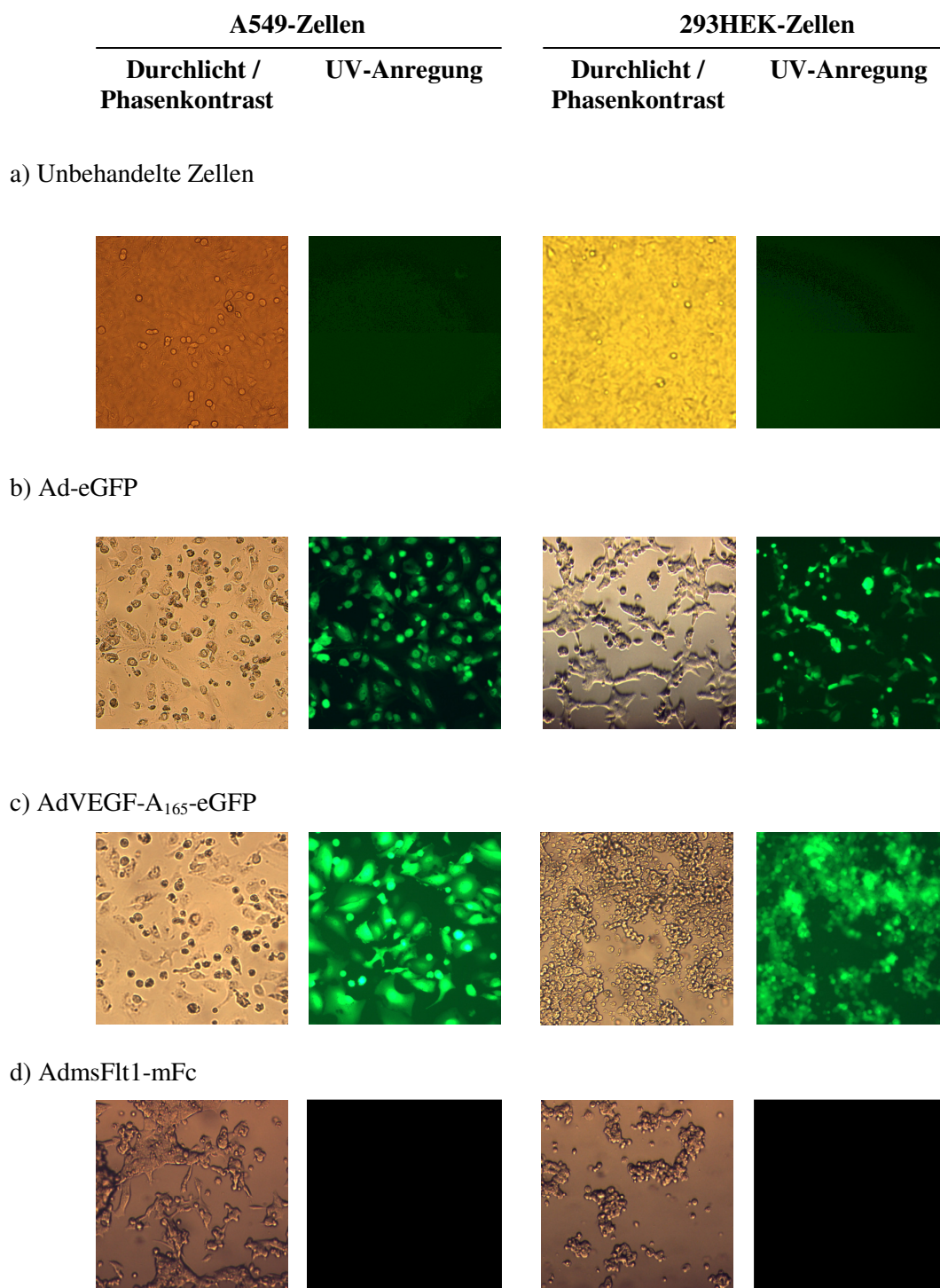


Abb. IV.3: Mikroskopische Kontrolle der Funktionalität rekombinanter Adenoviren die im Mausmodell eingesetzt wurden. Detektion der morphologischen Veränderung infizierter Zellen, und der eGFP Fluoreszenz als Zeichen der Genexpression. **a)** nicht infizierte Zellen **b)** Ad -eGFP infiziert **c)** AdVEGF-A₁₆₅-eGFP infiziert **d)** AdmsFlt1-mFc infiziert; Infektion von Zellen zur Produktion des exogenen Proteins (A549), und von Zellen zur Virusproduktion (293HEK); unterschiedliche Vergrößerungen: 100x und 200x

2.2 Qualitativer Nachweis adenoviral exprimierten Proteins

Nach adenoviraler Infektion von A549-Zellen mit AdmsFlt-1mFc wurden die exogenen Proteine im Überstand der Zellen nachgewiesen. Mittels einer SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese wurden die denaturierten Proteine der aufkonzentrierten Zellüberstände aus je 25µL Volumen aufgetrennt, durch einen semi-dry Blot auf eine Membran transferiert und mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Durch Anwendung eines anti-Flt-1 Antikörpers (Klon FLT-11), der sowohl murines als auch humanes Flt-1 detektiert, konnten beide Proteine in einem Blot detektiert werden. Als Positivkontrolle wurden hier rekombinante humane Proteine unterschiedlicher Größe eingesetzt. So konnte ein Signal bei dem fünf Domänen umfassenden sFlt-1(D5) bei 75kDa, und ein Signal bei dem sechs Domänen umfassenden sFlt-1(D6) bei 96 kDa nachgewiesen werden. Im Überstand AdmsFlt-1mFc infizierter A549-Zellen wurde erwartungsgemäß ein Signal für msFlt1-mFc bei 160kDa belegt, wobei ~120kDa auf das murine sFlt-1 entfallen (Abb. IV.4).

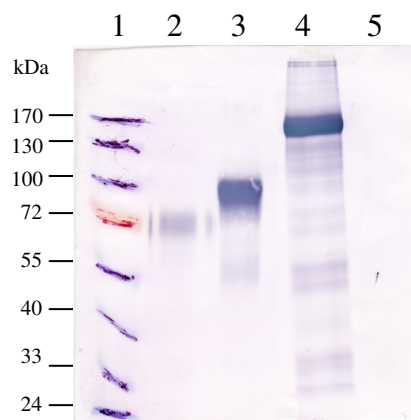


Abb. IV.4: Qualitativer Nachweis der Proteinexpression im Überstand adenoviral infizierter A549-Zellen

Der Western Blot zeigt mit anti-Flt-1 Antikörper (Klon FLT-11) detektierte Proteine. Dabei wurden aufgetragen in Spur 1: der Marker, in Spur 2: das Kontrollprotein sFlt-1(D5) 200ng, in Spur 3: Kontrollprotein sFlt-1(D6) 70ng, in Spur 4: Zellüberstand von AdmsFlt1mFc infizierten A549 Zellen, Spur 5: Zellüberstand nicht infizierter A549 Zellen. Spur 4 und 5 sind repräsentativ für Protein aus 25µL Zellüberstand.

2.3 Quantitativer Nachweis von akkumuliertem adenoviral exprimiertem Protein

Zur weiteren Kontrolle erfolgte abermals die Infektion von A549-Zellen mit rekombinanten Adenoviren. Dabei wurde die Proteinexpression bei Infektion mit konstantem Virustiter zu unterschiedlichen Zeitpunkten immunologisch bestimmt. Die quantitative Analyse der Zellüberstände zeigte einen zeitabhängigen Anstieg der exogenen Proteinexpression nach adenoviraler Infektion (Abb. IV.5). So konnte bei AdmsFlt1-mFc infizierten Zellen bei einer MOI von 100 ein Anstieg von $28,3 \pm 11,2 \text{ ng/mL}$ auf $432,8 \pm 18,7 \text{ ng/mL}$ gemessen werden. Bei Ad VEGF-A₁₆₅-eGFP infizierten Zellen (MOI 100) stieg die konzentrationsabhängige Expression von $14,3 \pm 1,6 \text{ ng/mL}$ auf $604,3 \pm 81,1 \text{ ng/mL}$, und endete in einer Sättigung bei $446,1 \pm 158,3 \text{ ng/mL}$.

So konnte gezeigt werden, dass adenoviral infizierte A549 Zellen viral transfiziertes Protein exprimieren, und eine positive Korrelation zwischen eingesetzter Adenoviruskonzentration und Quantität des exprimierten Proteins besteht.

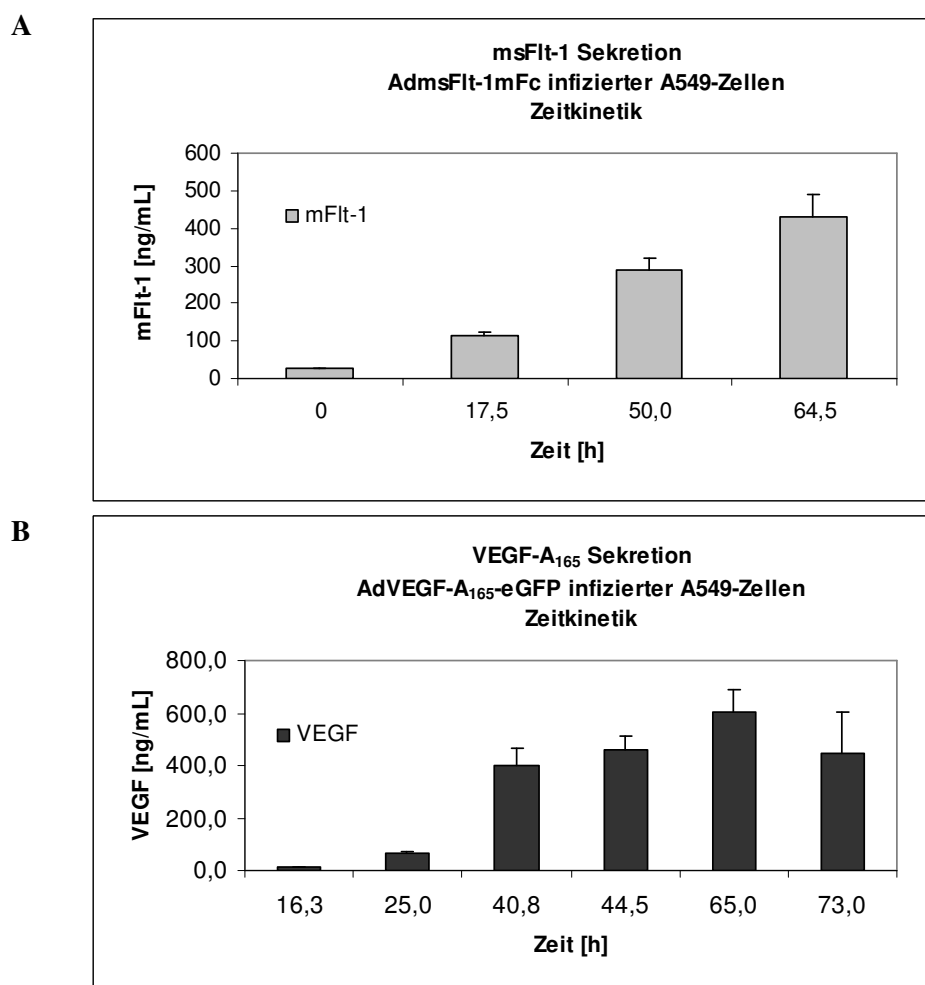


Abb. IV.5: Quantitativer Nachweis der Proteinexpression in adenoviral infizierten A549-Zellen

A) Zeitabhängige Expression von msFlt1-mFc in infizierten A549-Zellen. B) Zeitabhängige Expression von VEGF-A₁₆₅ in infizierten A549-Zellen.

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene adenovirale Konstrukte genutzt, deren Funktionalität bereits demonstriert werden konnte. Dazu zählte der Kontrollvirus Ad-eGFP (enhanced green fluorescent protein) und des weiteren ein Konstrukt zur Überexpression von murinem sFlt-1, fusioniert mit einem murinen Fc-tag, AdsFlt-1 Fc. Als drittes kam ein bicistronisches Konstrukt mit der genetischen Information für eGFP und VEGF-A165 zur Anwendung, dem Liganden des inhibitorisch agierenden Rezeptors msFlt-1, der in Bindungsstudien zur Neutralisierung der überexprimierenden sFlt-1 Aktivität eingesetzt werden sollte. Im soeben beschriebenen Kapitel konnte die Infektiosität dieser rekombinanten Adenoviren nachgewiesen werden. Es wurde durch Fluoreszenzmikroskopie gezeigt, dass mit eGFP-haltigen Adenoviren infizierte A549- und 293HEK-Zellen dieses Protein exprimieren. Des Weiteren konnte eine dosisabhängige Akkumulation an exogenem Protein im Überstand adenoviral infizierter A549-Zellen nachgewiesen werden.

Nach diesem Nachweis der Freisetzung des Zielproteins konnten die rekombinanten Adenoviren zuverlässig sowohl in Zellkulturexperimenten als auch im Tierversuch eingesetzt werden.

3. Das Mausmodell

Nachdem im Rattenmodell bereits gezeigt werden konnte, dass adenovirale sFlt-1 Überexpression präeklampsische Symptome im Tier induziert, sollte in dieser Arbeit nun ein entsprechendes Mausmodell etabliert werden (Maynard et al. 2003).

Ziel dieser Arbeit war es, den Zustand der Präeklampsie als angiogene Dysfunktion im Mausmodell zu simulieren, und als eine Folge der Inhibierung des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors VEGF-A darzustellen. Die durch adenovirale Überexpression von sFlt-1, einem VEGF-A und PlGF Inhibitor, gesetzten Effekte sollten dann sowohl durch Co-Expression des Liganden VEGF-A als auch durch parallele Applikation eines Antikörpers neutralisiert werden.

Um dieses Ziel zu realisieren wurden in diesem Mausmodell adulte weibliche Balb/c Mäuse eingesetzt. Die Experimente begannen mit der Applikation der Adenoviren *i.v.* durch die Schwanzvene, und liefen über einen Zeitraum von 10 Tagen. Danach wurde ein Teil der Tiere zur Gewinnung von Sammelurin nochmals für 24h in einem Stoffwechselkäfig gehalten. Blutproben wurden zu Beginn und am Ende der Experimente genommen, um die Expression der exogenen transferierten Proteine zu überprüfen.

Für die Versuche wurden unterschiedliche Gruppen von Mäusen untersucht. So gab es für die Simulation des präeklampsischen Zustandes die Gruppe der unbehandelten Mäuse (*unbehandelt*), die Gruppe der Mäuse die mit Kontrollvirus behandelt wurden (*Ad-eGFP*), und die Gruppe der murinen sFlt-1 Überexpression mit hohen Dosen (*AdmsFlt1mFc*-Behandlung $7,5 \times 10^9$ pfu: *AdsFlt-1 H*).

Für die Neutralisierungsversuche wurden gleichzeitig zwei rekombinante Adenoviren eingesetzt, die unterschiedliche Proteine exprimieren, den Liganden VEGF und seinen korrespondierenden löslichen Rezeptor sFlt-1. In initialen Versuchen konnte bereits demonstriert werden, dass AdVEGF schon in geringen Konzentrationen eine mortale Wirkung in Mäusen zeigt, was auch schon bekannt war (Thurston et al. 2000). Aus diesem Grund wurde die Menge an exprimiertem sFlt-1 der des exogenen VEGFs angepasst, und mit geringeren Dosen an *AdsFlt-1* gearbeitet. Im Rahmen der Neutralisierungsversuche gab es dann demzufolge die Einteilung in die Gruppe der geringen murinen sFlt-1 Überexpression (*AdmsFlt1mFc*-Behandlung $3,5 \times 10^9$ pfu: *AdsFlt-1L*), die Gruppe der VEGF-A₁₆₅ Überexpression (*AdVEGF-A₁₆₅-eGFP* –Behandlung 1×10^8 pfu: *AdVEGF*) und die Gruppe der Co-Expression von murinem sFlt-1 und VEGF-A₁₆₅ (*AdmsFlt1mFc* $3,5 \times 10^8$ pfu/ *AdVEGF-A₁₆₅-eGFP* 1×10^8 pfu –Behandlung: *AdsFlt-1/ AdVEGF*). Für die Strategie der

Blockierung der Liganden- sFlt-1- Interaktion über einen Antikörper wurde der neutralisierende Flt-1 Antikörper KM1750 eingesetzt (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Masabumi Shibuya von der Universität Tokio, und der Firma BIOWA aus Tokio, Japan).

3.1 Simulation eines Präeklampsie-ähnlichen Zustandes als Folge der systemischen Inhibierung von VEGF-A in der Maus

3.1.1 Nachweis exogener Transkripte in Lebergewebe

Leberzellen enthalten eine hohe Anzahl an Coxsackie-Adenovirus-Rezeptoren, die Adenoviren den Zugang in die Wirtszelle ermöglichen (Muzzin et al. 1996). Aus diesem Grund akkumulieren rekombinante Adenoviren nach intravenöser Applikation überwiegend in der Leber. Um die Transkription adenoviral transferierter Gene im murinen Organismus nachzuweisen wurde aus Lebergewebe behandelter Tiere RNA präpariert, und diese zu cDNA umgeschrieben. Durch RT-PCR konnten exogene Transkripte des eGFP Gens als PCR-Produkt von 735bp in Lebergewebe von Ad-eGFP und AdVEGF behandelten Tieren nachgewiesen werden. (Abb. IV.6). Der Nachweis exogener Transkripte des adenoviral überexprimierten msFlt-1mFc war nicht möglich, da hier nicht zwischen endogenem und exogenem Protein unterschieden werden kann.

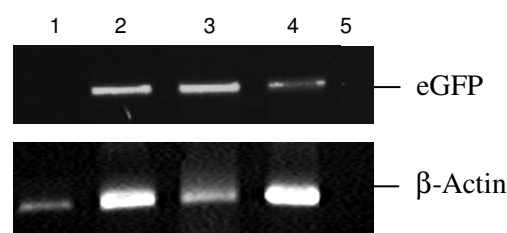


Abb. IV.6: Nachweis adenoviraler Transkripte in Lebergewebe

Spur 1: PCR-Produkt einer unbehandelten Maus, Spur 2: PCR-Produkt einer Ad-eGFP behandelten Maus; Spur 3 + 4: PCR-Produkt einer Ad-VEGF- behandelten Maus; Spur 5: Negativkontrolle

3.1.2 Nachweis exogener Proteine in der Zirkulation und Geweben

Voraussetzung für das Modell ist die Expression transferierter Gene und die Freisetzung des Proteins im murinen Organismus. Es sollte deshalb nachgewiesen werden, dass exogenes Protein sowohl in der Leber als auch in der Zirkulation, und letztendlich in der Niere vorhanden ist. Dabei wurden die Konzentrationen des endogenen murinen Flt-1 in unbehandelten und Kontrollvirus-behandelten Tieren immunologisch gemessen, als auch die Mengen an endogenem und exogenem murinem Flt-1 in behandelten Tieren.

Flt-1 Konzentration in Leberlysats

Als erstes wurde die Leber transduzierter Tiere auf dieses Protein hin untersucht. Ein kleiner Teil des schockgefrorenen Organs wurde zur Stabilisierung des Proteins in RIPA-Puffer homogenisiert, und die Zelltrümmer sedimentiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes im Überstand, dem Lysat. Durch Einsatz eines immunologischen Testes (ELISA) konnte die Konzentration an Flt-1 im Lysat der 1:50 verdünnten Proben ermittelt werden. Die Konzentrationen wurden dann in Bezug zum jeweiligen Proteingehalt gesetzt. Diese Normierung ermöglichte den Vergleich der Proben untereinander (Abb. IV.7).

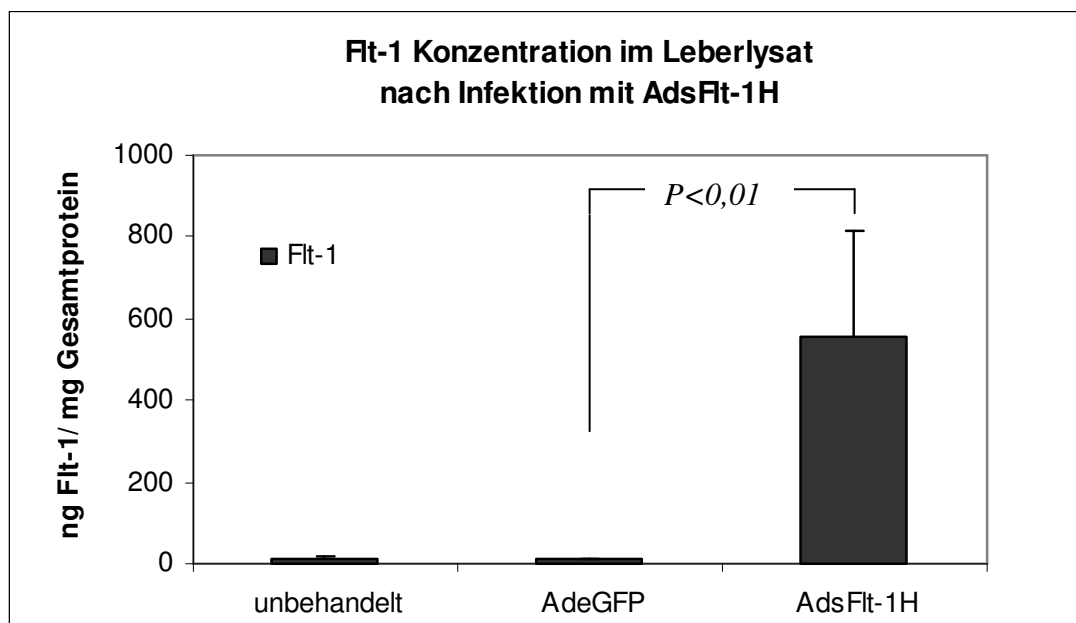


Abb. IV.7: Flt-1 Konzentration im Leberlysats nach Infektion mit AdsFlt-1H

Konzentration im unbehandelten Tier (n=12); Konzentration im AdeGFP- behandelten Tier (n=9); Konzentration im AdsFlt-1H- behandelten Tier (n=10);

Im Leberlysate AdsFlt1H- behandelter Tiere konnte zehn Tage nach intravenöser Applikation $555,7 \pm 262$ ng Flt-1/mg Gesamtprotein gemessen werden. Im Leberlysate unbehandelter Tiere hingegen wurden $14,6 \pm 7,9$ ng Flt-1/mg Gesamtprotein, und in Ad-eGFP infizierten Tieren $9,8 \pm 3,9$ ng Flt-1/mg Gesamtprotein nachgewiesen. (Abb. IV.7). Das zeigt eine statistisch signifikante Zunahme der sFlt-1 Konzentration in der Leber AdsFlt-1H behandelter Tiere um mehr als das 55-fache gegenüber der Konzentration in AdeGFP behandelten Tieren.

Der starke Anstieg der sFlt-1 Konzentration im Lebergewebe AdsFlt-1H transduzierter Tiere wird auf die Expression des adenoviralen Gens für sFlt-1 zurückgeführt, da diese Konzentration sich deutlich von der Gruppe unbehandelter und AdeGFP infizierter Tiere abhebt.

Flt-1 Konzentration im Plasma

Der überwiegend in der Leber exprimierte exogene Inhibitor sFlt-1 gelangt über die Zirkulation in den gesamten Organismus. Diese zirkulierende Belastung sollte deshalb ebenfalls bestimmt werden. Nach Ablauf des zehntägigen Versuchs wurde den Tieren Blut entnommen, dieses heparinisiert und durch Sedimentation der zellulären Bestandteile Plasma gewonnen. Die Konzentration an enthaltenem Flt-1 wurde wieder durch ELISA-Messungen belegt. So wiesen Tiere der AdsFlt-1H Gruppe Werte von $89,1 \pm 27,6$ ng Flt-1/mL auf, in den Kontrollgruppen der unbehandelten und Ad-eGFP -behandelten Mäuse hingegen lag die Konzentration dieses Proteins unterhalb der Detektionsgrenze (Abb. IV.8).

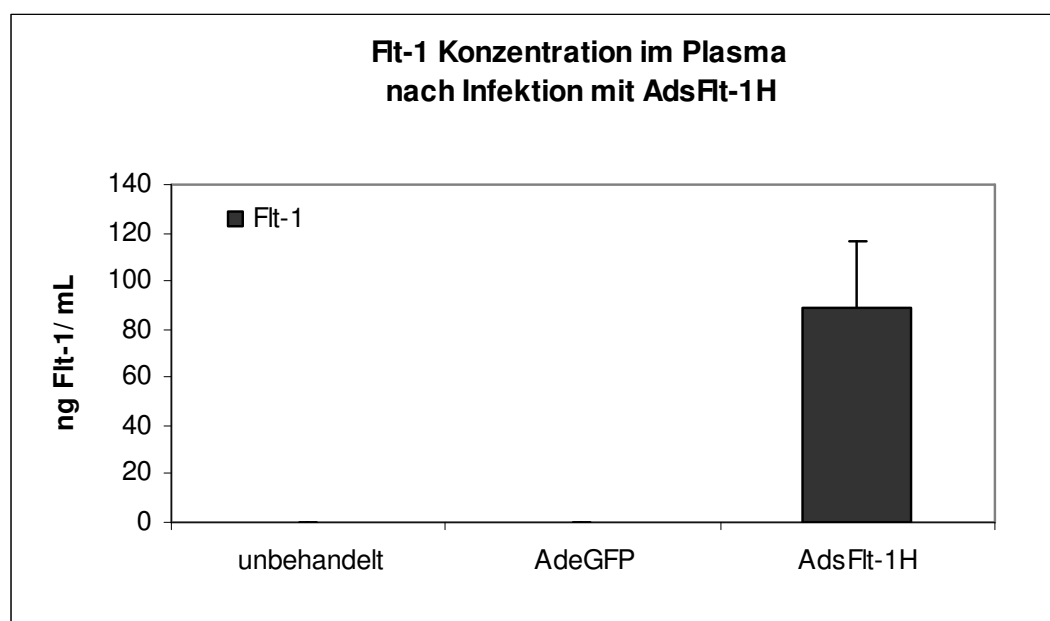


Abb. IV.8: Flt-1 Konzentration im Plasma nach Infektion mit AdsFlt-1H

Konzentration im unbehandelten Tier (n=10); Konzentration im AdeGFP- behandelten Tier (n=4); Konzentration im AdsFlt-1H- behandelten Tier (n=10);

Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtung im Lebergewebe und die Schlussfolgerung, dass hier exogenes sFlt-1 Protein nachgewiesen wurde das in unbehandelten und AdeGFP-infizierten Kontrolltieren nicht vorhanden ist.

Proteinexpression am Tag 6 und Tag 10 des Experimentes

Zur Beurteilung der Expression wurden zudem Stichproben von Plasma am Tag 6 und Tag 10 der Behandlung entnommen und verglichen (Abb. IV.9). Die AdsFlt-1H behandelten Tiere zeigten nach sechs Tagen eine Konzentration von $352,7 \pm 7,2$ ng Flt-1/mL (n=2), und am Ende des Versuchs an Tag 10 eine Konzentration von $140,6 \pm 28,6$ ng Flt-1/mL (n=2). Die Konzentration an Tag 6 liegt damit um das 2,5-fache höher verglichen mit dem Gehalt an Flt-1 im Plasma am Tag 10. Trotzdem diese Werte nur repräsentativ für zwei AdsFlt-1H behandelte Tiere sind, so wird doch ein Abfall der zirkulierenden sFlt-1 Konzentration im Verlauf des zehntägigen Experimentes deutlich.

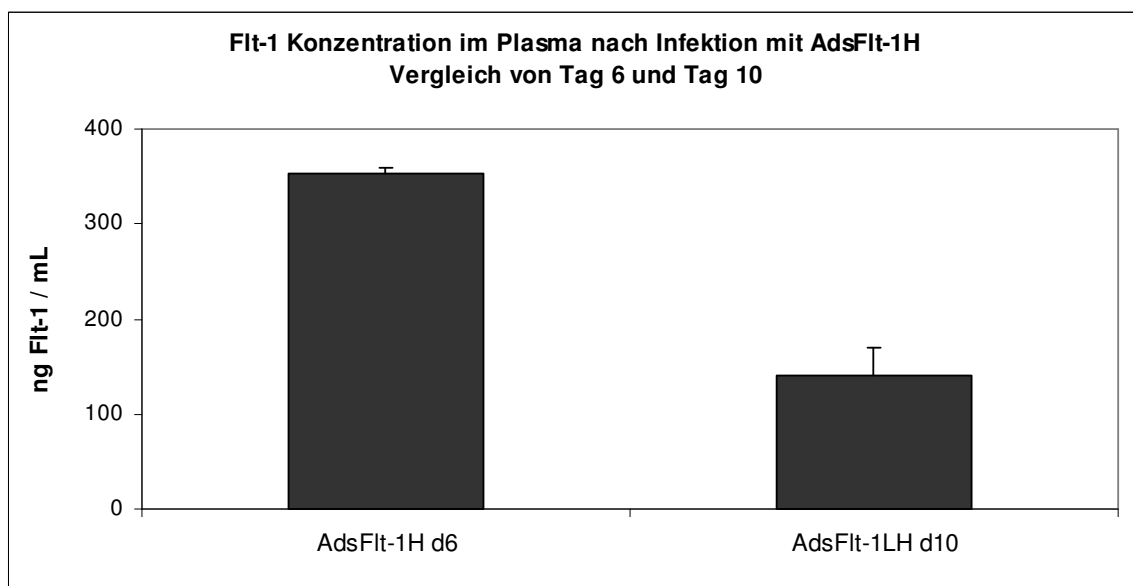


Abb. IV.9: Flt-1 Konzentration im Plasma nach Infektion mit AdsFlt-1H, Vergleich von Tag 6 und Tag 10 des Experimentes. Konzentration von Flt-1 im Plasma AdsFlt-1H behandelter Tiere nach 6 Tagen der Expression und nach 10 Tagen der Expression. Die Werte sind Mittelwerte und repräsentativ für zwei Tiere.

Flt-1 Konzentration im Nierenlysat

Die renale Schädigung stellt eines der drei Schlüsselsymptome der Präeklampsie dar. Da die Niere stark durch VEGF reguliert wird und in ihrer Funktion von VEGF abhängig ist, sollte sich eine Änderung der VEGF-Konzentration in der Nierenmorphologie widerspiegeln. Aus diesen Gründen repräsentiert die Niere in diesem Modell das Organ an dem sFlt-1 induzierte Veränderungen am ehesten abgelesen werden können.

So sollte hier nachgewiesen werden, dass die renale Schädigung Ausdruck der hohen lokalen Flt-1 Konzentration ist. Die Herstellung des Nierenlysates erfolgte analog zu der des Leberlysates, die bereits beschrieben wurde. Messungen im Lysat der Niere ergaben bei Tieren der AdsFlt-1H Gruppe eine Konzentration von $87,7 \pm 4,5$ ng Flt-1/ mg Gesamtprotein. Die Kontrollgruppe der unbehandelten Tiere zeigte $30,2 \pm 3,6$ ng Flt-1/ mg Gesamtprotein, während die Gruppe der Kontrollvirus-infizierten Tiere Ad-eGFP Werte von $37,1 \pm 21,8$ ng Flt-1/ mg Gesamtprotein aufwies. Die in der AdsFlt-1H-Gruppe bestimmten Werte entsprechen damit einer 2,4-fachen Zunahme der sFlt-1 Konzentration gegenüber der AdeGFP-Kontrollgruppe, und der Unterschied zwischen den Gruppen ist statistisch wahrscheinlich (Abb. IV.10).

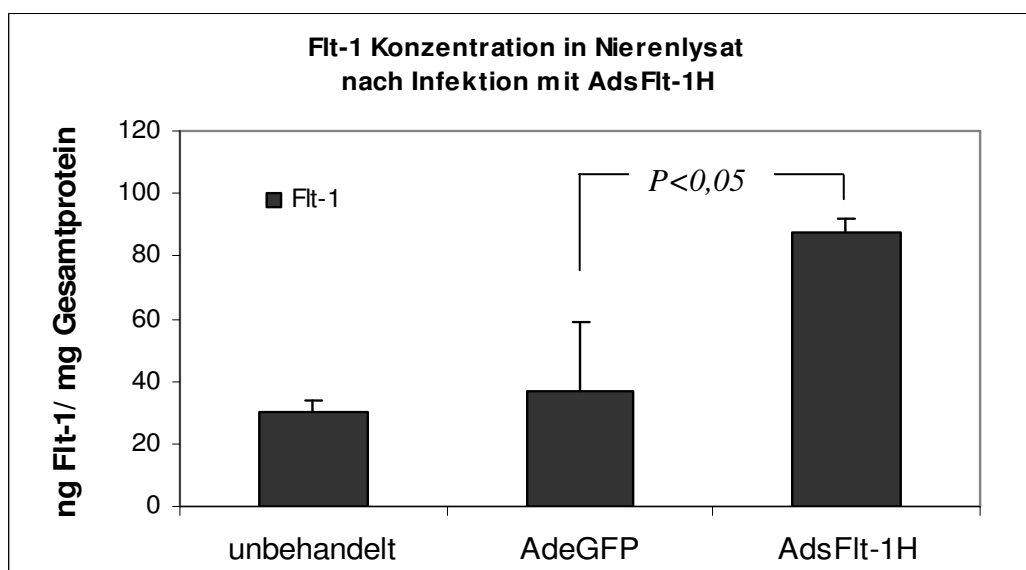


Abb. IV.10: Flt-1 Konzentration im Nierenlysat nach Infektion mit AdsFlt-1H

Konzentration im unbehandelten Tier (n=3); Konzentration im AdeGFP- behandelten Tier (n=3); Konzentration im AdsFlt-1H- behandelten Tier (n=2)

Diese Resultate zeigen ebenfalls in der Niere einen Anstieg der Flt-1 Konzentration in AdsFlt-1H infizierten Tieren, im Vergleich zu den Kontrollen, der auf die Expression des exogenen Proteins zurückgeführt wird. Die in den Kontrollen nachgewiesenen Konzentrationen entsprechen endogenem Protein, da VEGFR-1 und VEGFR-2 in der Niere in hohem Maße exprimiert werden (Simon et.al. 1998).

Flt-1 Konzentration im Harn

Der Harn repräsentiert das Filtrat der Niere und enthält im Normalfall toxische Substanzen sowie Abbauprodukte des Stoffwechsels die über die Niere herausgefiltert werden. Der lösliche Rezeptor sFlt-1 stellt mit einer Größe von 130kDa ein makromolekulares Protein dar, das aufgrund seiner Größe den renalen Filter nicht passieren kann (Kalluri et al. 2006).

Dennoch ergaben immunologische Messungen im Harn der AdsFlt-1H Gruppe eine Konzentration von $27,7 \pm 27,6$ ng Flt-1/mL, während die der Kontrollgruppen unterhalb der Nachweisgrenze lag (Abb. IV.11).

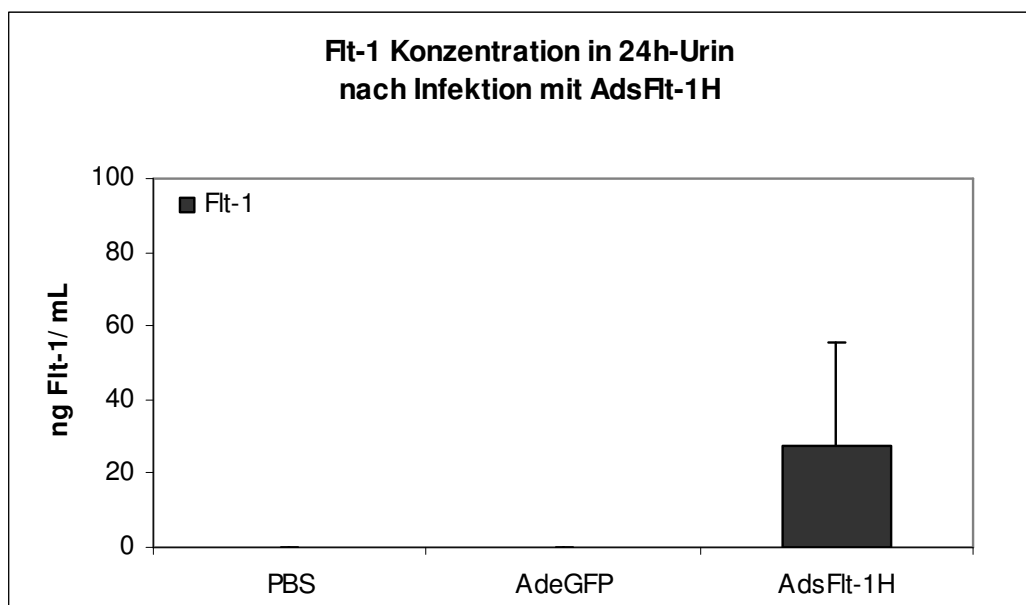


Abb. IV.11: Flt-1 Konzentration im 24h-Urin nach Infektion mit AdsFlt-1H

Konzentration im unbehandelten Tier (n=3); Konzentration im AdeGFP- behandelten Tier (n=2); Konzentration im AdsFlt-1H-behandelten Tier (n=2)

Diese Ergebnisse zeigen eine messbare Konzentration an Flt-1 im Harn AdsFlt-1H behandelter Tiere. Da dieses Protein aufgrund seiner Größe von 130 kDa den renalen Filter im gesunden Zustand nicht passieren kann, gibt diese Messung einen Hinweis auf eine mögliche Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere (Kanwar et al. 1979).

Proteinexpression in Leber und Plasma bei Anwendung unterschiedlicher Viruspräparationen

Im Rahmen der Tierexperimente wurden verschiedene Viruspräparationen an AdsFlt-1 eingesetzt. Diese differierten hinsichtlich des induzierten Effektes. Als Beispiel ist in Abb. IV.12. der Vergleich der Proteinexpression in der Leber bei Applikation gleicher viraler Dosen dargestellt. Die Behandlung mit 5×10^9 pfu AdsFlt-1 ergab bei Viruspräparation Nr.194 eine Flt-1 Konzentration von $426 \pm 178,4$ ng Flt-1/mg Gesamtprotein und bei Nr.195 einen Wert von $393,3 \pm 53,6$ ng Flt-1/mg Gesamtprotein. Die Viruspräparationen Nr.196 und Nr.197 induzierten die Expression von $278,5 \pm 7,2$ ng Flt-1/mg Gesamtprotein, beziehungsweise $155 \pm 8,5$ ng Flt-1/mg Gesamtprotein.

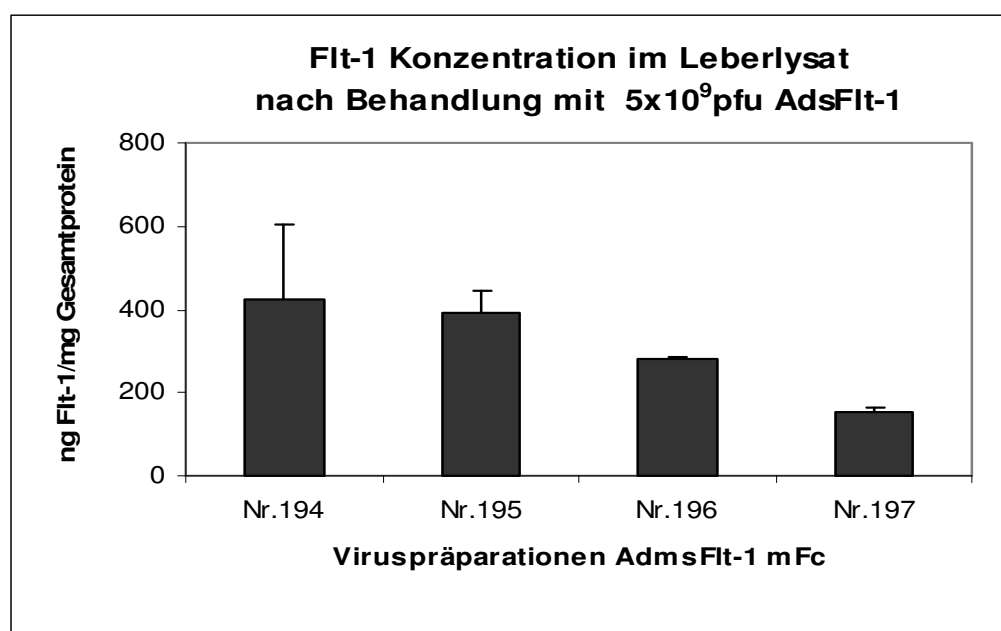


Abb. IV.12: Flt-1 Konzentration im Leberlysät nach Anwendung verschiedener Viruspräparationen

Dargestellt ist die Konzentration an endogenem und exogenem Flt-1 im Leberlysät von Tieren die mit verschiedenen Viruspräparationen an AdsFlt-1 behandelt wurden. Es wurde jeweils die gleiche Dosis von 5×10^9 pfu appliziert. Daten der Viruspräparationen Nr.194, Nr.195, Nr.196 und Nr.197 von je zwei untersuchten Tieren sind gezeigt.

Die Messungen korrespondierender Blutproben bestätigten den in der Leber beobachteten Trend (Abb. IV.13.). So wurde im Plasma des mit AdsFlt-1H Nr.194 behandelten Tieres ein Wert von $85,7 \pm 8,9$ ng Flt-1/mL, und im Plasma des AdsFlt-1H Nr.195 behandelten Tieres $84,1 \pm 33,7$ ng Flt-1/mL nachgewiesen. Die Konzentration bei Anwendung der Viruspräparation Nr.196 belief sich auf $56,2 \pm 12,7$ ng Flt-1/mL, und nach Applikation der Nr.197 auf $9,5 \pm 2,7$ ng Flt-1/mL.

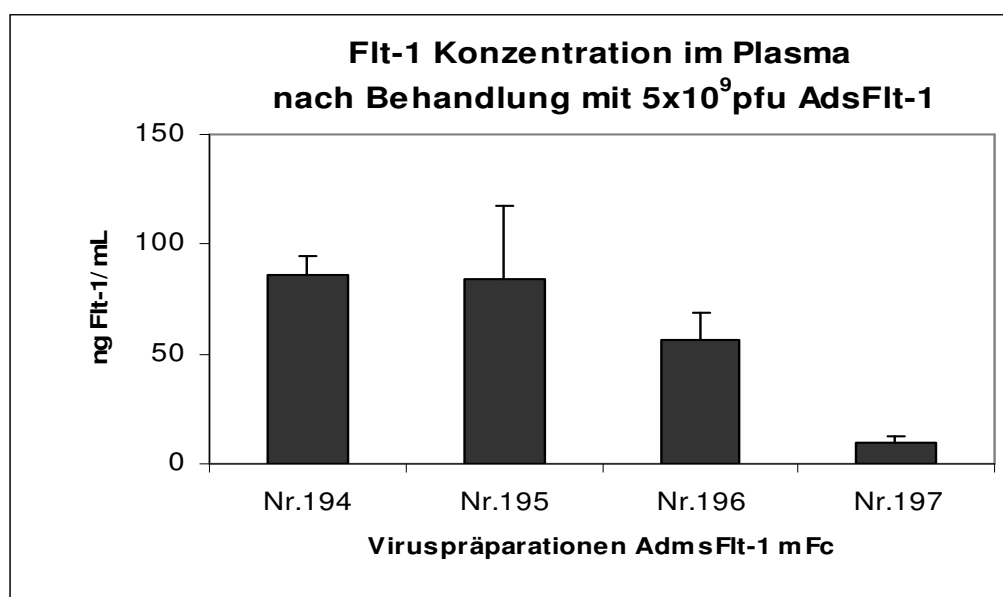


Abb. IV.13: Flt-1 Konzentration im Plasma nach Anwendung verschiedener Viruspräparationen

Konzentration an endogenem und exogenem Flt-1 im Plasma von Tieren die mit verschiedenen Viruspräparationen an AdsFlt-1 behandelt wurden. Applikation der gleichen Dosis 5×10^9 pfu. Darstellung von vier Präparationen Nr.194, Nr.195, Nr.196 und Nr.197.

Die Aktivität der Proteinexpression der Präparationen Nr. 194 und Nr.195 zeichnet sich deutlich von der der Präparationen Nr.196 und Nr.197 ab. Die Konzentration an nachgewiesenem exprimiertem Protein nimmt mit fortschreitender Viruspräparation ab. Da die jeweils neu zu produzierende Präparation mit einer konstanten Verdünnung aus der vorangegangenen infiziert wurde, ist diese Beobachtung nachvollziehbar. In dieser Arbeit wurde ursprünglich nicht von der Notwendigkeit der Herstellung verschiedener Viruspräparationen ausgegangen. Aus diesem Grund wurde kein Virusstock angelegt, der zur Herstellung der einzelnen Präparationen als Ausgang dienen sollte, und so eine weitgehend gleichbleibende Konzentration der Viruspräparationen gewährleistet hätte.

Da jedoch die einzelnen Präparationen nochmals *in-vivo* auf einen Effekt in der Niere hin überprüft wurden, hat die Differenz im Titer letztendlich keinen Einfluß auf die Experimente. Des Weiteren wurde für die Beantwortung der einzelnen Fragestellungen überwiegend die gleiche Viruspräparation eingesetzt. So kam beispielsweise im Fall der Induktion präeklampscher Symptome fast ausschließlich die Präparation Nr.196 zum Einsatz. Auf diese Weise konnte die Reproduzierbarkeit gewährleistet, und zuverlässige Ergebnisse erzielt werden.

3.1.3 Morphologische Veränderungen von Leber und Milz

Der starke Einfluß der kurzen Behandlungsdauer spiegelte sich unter anderem in der Hypertrophie zweier Organe wieder, der Leber und der Milz. Deren morphologische Veränderung korrelierte mit dem Grad der pathologischen Nierenveränderung in behandelten Mäusen.

Makroskopische Veränderungen der Leber

Bei der Leber wurde eine Anschwellung beobachtet, die abhängig vom Adenovirus (Ad-eGFP, AdsFlt-1) und von dessen Konzentration unterschiedlich ausfiel (Abb. IV.14). So konnte eine geringe Lebervergrößerung nach Infektion mit Kontrollvirus Ad-eGFP ($1,44 \pm 0,26\text{g}$), verglichen mit der Lebermasse von unbehandelten Mäusen ($0,97 \pm 0,15\text{g}$) beobachtet werden. Die Behandlung mit hohen Konzentrationen an AdsFlt-1 resultierte in einer Verdopplung des Lebergewichtes auf $2,02 \pm 0,18\text{g}$. Der Puffer, in dem die Viren aufbewahrt wurden, zeigte lediglich einen geringen Einfluß auf das Lebergewicht ($1,13 \pm 0,11\text{g}$). Des Weiteren wurde eine positive Korrelation zwischen der Zunahme des Lebergewichtes und der Schwere der Nierenschädigung verzeichnet.

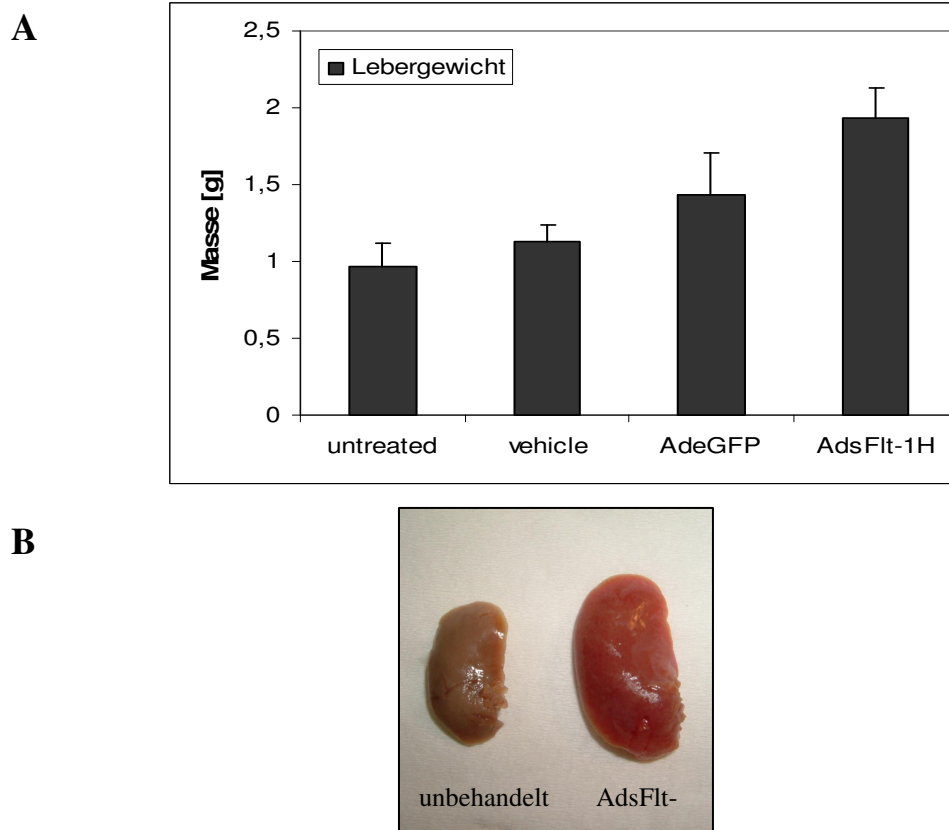


Abb. IV.14: Makroskopische Veränderungen der Leber nach adenoviraler sFlt-1 Überexpression

A) Es sind die durchschnittlichen Lebermassen unbehandelter Mäuse (n=18); mit Virus-Puffer behandelte Mäuse (n=3); Ad-eGFP behandelte Mäuse (n=13) und AdsFlt-1H behandelte Mäuse (n=18) dargestellt. **B)** Fotografie des großen Leberlappens einer unbehandelten und einer AdsFlt-1H behandelten Maus

Makroskopische Veränderungen der Leber bei unterschiedlichen Viruspräparationen

Des Weiteren wurde eine Abhängigkeit zu verschiedenen Viruspräparationen des Flt-1 Virus registriert, die wahrscheinlich ebenfalls von der abweichenden Intensität der einzelnen Präparationen herrührt. So zeigten Tiere, die mit dem gleichen Virustiter von $5,0 \times 10^9$ pfu unterschiedlicher Viruspräparationen behandelt wurden, ebenfalls ungleiche Lebermassen. Tiere, infiziert mit Viruspräparation Nr.194 wiesen ein Lebergewicht von $2,23 \pm 0,15$ g auf, die Behandlung mit Viruspräparation Nr.195 ergab ein durchschnittliches Gewicht von $2,16 \pm 0,04$ g, während die Infektion mit Viruspräparation Nr.196 in einem wesentlich geringeren Lebergewicht von $1,89 \pm 0,05$ g resultierte (Abb. IV.15). Die Präparations-bedingten Abweichungen im Lebergewicht fielen also eher gering aus.

Dieser Trend wurde durch die unterschiedlichen Volumina der Viruspräparationen bestätigt, die nötig waren um einen Effekt im Tier zu induzieren. Darauf soll im nächsten Kapitel näher eingegangen werden.

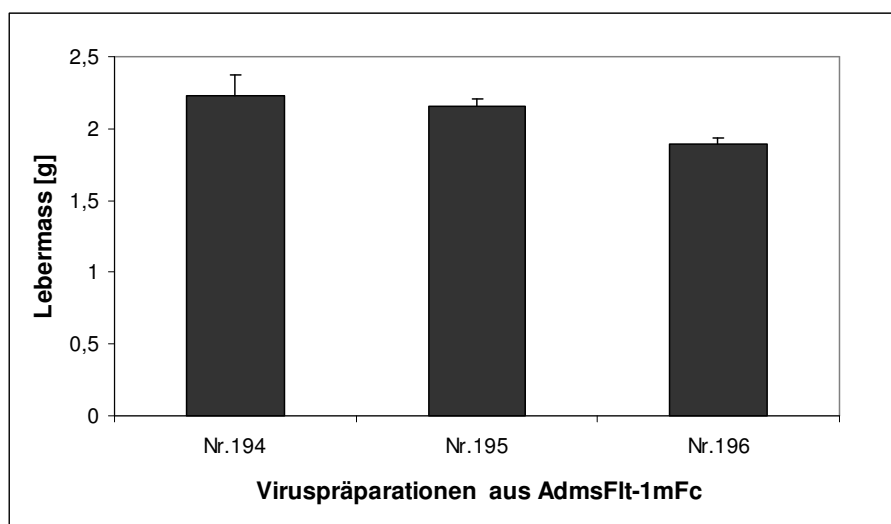


Abb. IV.15: Vergleich der Lebermassen nach Anwendung unterschiedlicher Viruspräparationen

Es sind die Lebermassen aus der Behandlung mit drei unterschiedlichen Viruspräparationen (Nr.194, Nr.195, Nr.196) dargestellt. Bei jeder Behandlung wurden 5×10^9 pfu der jeweiligen Viruspräparation intravenös in die Schwanzvene appliziert. Die Daten sind Mittelwerte und repräsentativ für zwei Tiere.

Morphologische Veränderungen der Leber

Da die Adenoviren nach intravenöser Injektion aufgrund des Rezeptortropismus in der Leber akkumulieren, und die Konzentration des exogenen Proteins in diesem Gewebe am höchsten ist, verglichen mit Plasma und Niere (vgl. Kapitel IV.3.1.2.), wurde ebenfalls der histopathische Effekt dieser Faktoren auf die Leber stichprobenartig untersucht. Dabei zeigten sich Veränderungen in Kontrollvirus-, VEGF- und sFlt-1 behandelten Tieren. Unbehandelte Tiere wiesen keinen pathologischen Leberbefund auf (Abb. IV.16a). Die AdeGFP-infizierten Tiere (Abb. IV.16b) zeigten überwiegend keine Schädigung, vereinzelt trat eine Schädigung in Form von diffuser Megalozytose, mittelgroßer extramedullärer Haematopoese und aktivierten Endothelzellen auf, so dass die Schädigung auf viralen Befall und die Expression des eGFP zurückgeführt werden kann, in dessen Folge toxische Effekte auftreten können (Liu et al. 1999). In AdVEGF-infizierten Tieren (Abb. IV.16c) konnte eine geringgradige extramedulläre Hematopoese festgestellt werden, die zum Einen ebenfalls als Folge der eGFP-Expression aufgefasst werden kann, zum Anderen jedoch auch das Resultat exprimiertem VEGF-Proteins sein kann. Die Applikation von AdsFlt-1H (Abb. IV.16d) resultierte ebenfalls in einer gering- bis mittelgradigen extramedullären Hematopoese, war jedoch mit dem Auftreten multifokaler Megalozyten, und aktivierter Endothelzellen verbunden. In einigen Präparaten konnten eosinophile intranukleare Einschlusskörperchen (*Councilman Bodies*) nachgewiesen werden, deren Präsenz oft bei adenoviralen Infektionen beobachtet wird (pers. Kommunikation, Prof. Dr. Gruber, Veterinärpathologe, FU Berlin).

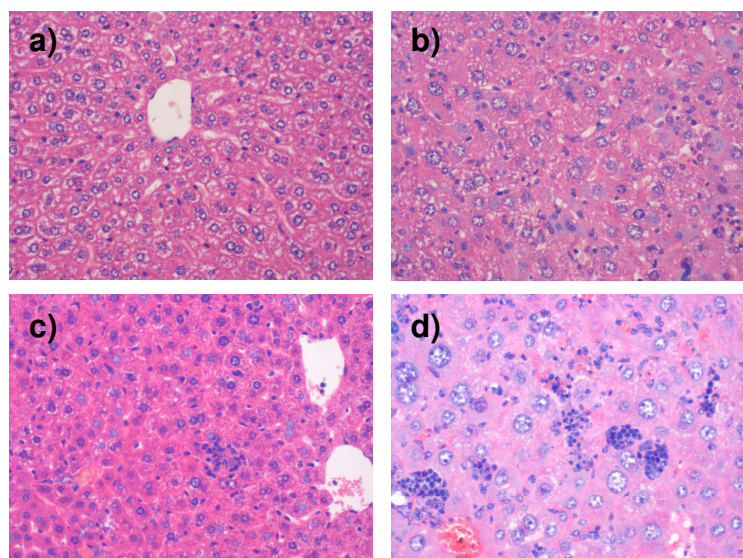


Abb. IV.16: Histologie der Leber nach sFlt-1 Überexpression

Lebergewebe von Mäusen **a)** unbehandelt (PBS), **b)** AdeGFP-(1×10^9 pfu) behandelt, **c)** AdVEGF-($1,5 \times 10^8$ pfu) behandelt, **d)** AdsFlt-1H-($7,5 \times 10^9$ pfu) behandelt. Die Schnitte wurden HE gefärbt. Dargestellt ist eine 40x Vergrößerung. Erläuterungen im Text.

Makroskopische Veränderungen der Milz

Die makroskopischen Veränderungen der Milz als lymphatisches Organ zeigten einen Zusammenhang zwischen adenoviraler Infektion und Adenoviruskonzentration. So wurde in Ad-eGFP ($2\text{-}4 \times 10^9$ pfu) behandelten Tieren eine Milzlänge von $2,0 \pm 0,15\text{cm}$, und in AdsFlt-1H – infizierten Tiere ($5\text{-}7,5 \times 10^9$ pfu) eine Milzlänge von $2,7 \pm 0,27\text{cm}$ gemessen, während sie in unbehandelten Tieren nur $1,48 \pm 0,03\text{cm}$ betrug (Abb. IV.17). Der Trend dieser Beobachtungen bestätigte sich nahezu in jedem Experiment, die Abbildung (Abb. IV.17) zeigt die Ergebnisse aus einem repräsentativen Versuch. Diese Beobachtungen wurden digital festgehalten jedoch nicht weiter untersucht. Der Effekt wird auf die immunologische Reaktion zurückgeführt, die bei adenoviraler Infektion ausgelöst wird, und die Milz als immunologisches Organ unmittelbar betrifft.

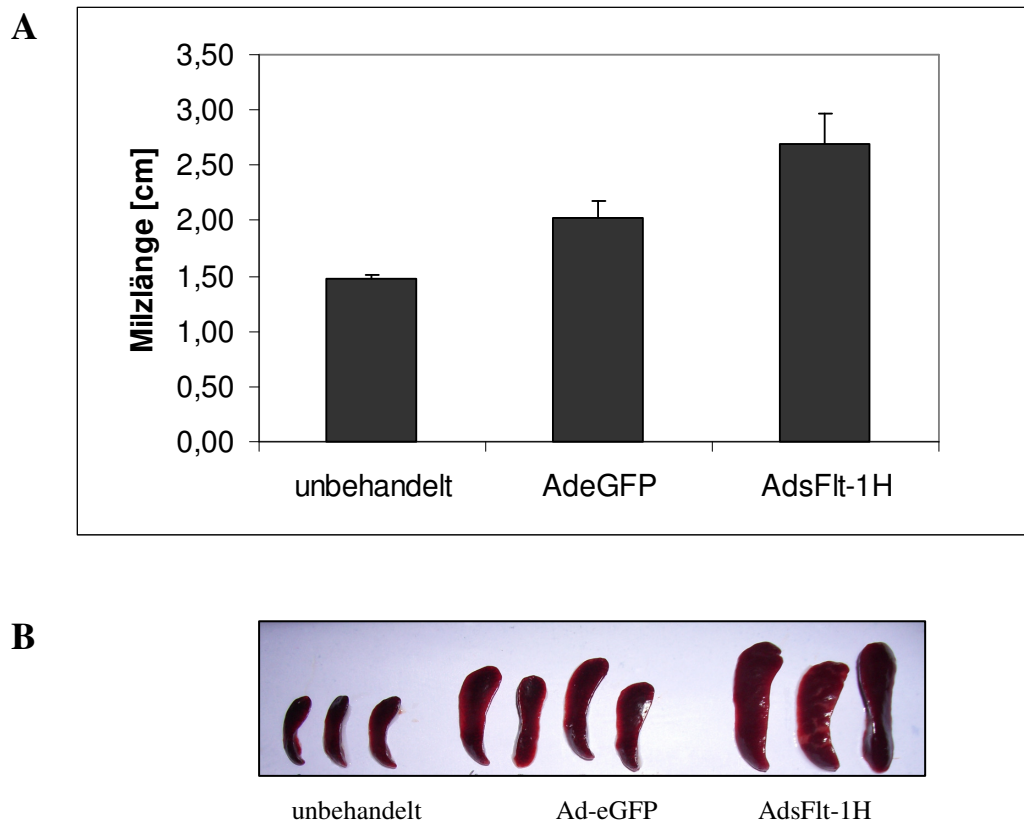


Abb. IV.17: Makroskopische Veränderungen der Milz nach sFlt-1 Überexpression

Dargestellt sind Ergebnisse eines Experiments, das den Trend nahezu jeden Tierversuchs zeigt und damit repräsentativ für die durchgeführten Versuche ist. **A)** Es sind die Milzlängen unbehandelter Tiere ($n=3$), Ad-eGFP behandelter Tiere ($n=4$) und AdsFlt-1H behandelter Tiere ($n=3$) dargestellt. Die Daten sind Mittelwerte und repräsentativ für die mit n angegebenen Tiere. **B)** Fotografien der in A) evaluierten Organe.

3.1.4. Histologische Veränderungen der Niere nach sFlt-1 Überexpression

Eine der vielfältigen Funktionen der Niere ist die Ultrafiltration des Blutes, und damit die Exkretion von Abbaustoffen und Giften aus dem Körper. Das Blut durchfließt dabei die Kapillarschlingen in den Glomeruli, den Funktionseinheiten der Niere. Die Wandung dieser Kapillaren besteht aus einem dreischichtigen Filter der eine hoch spezialisierte Form des Endothels repräsentiert, das fenestrierte Endothel. Essentiell für die Aufrechterhaltung dieser Sonderform ist die lokale Präsenz einer definierten Konzentration an VEGF, das durch die Podozyten sekretiert wird. Im Falle der Präeklampsie zirkulieren hohe Konzentrationen des VEGF-Inhibitors sFlt-1 im maternalen Kreislauf, und inaktivieren die VEGF-Moleküle, indem sie diese binden und so die Signalkaskade unterbrechen. In der Niere sind die Auswirkungen als schwere charakteristische Änderungen des Glomerulums zu erkennen, in Form der glomerulären Endotheliose.

Nach zehn Tagen der adenoviralen Überexpression von eGFP und sFlt-1H wurden Nierengewebe und einzelne Lebergewebe histologisch begutachtet. Zur Darstellung von Veränderungen im Gewebe kamen unterschiedliche Färbemethoden von Paraffinschnitten, wie die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E), die Periodisch-Saure-Schiffs Reaktion (PAS) oder die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung (MG) zur Anwendung. Zur intensiven Examination des fenestrierten Endothels wurden einzelne Nierengewebe elektronenmikroskopisch untersucht.

Histopathologie der Niere

Die histopathologische Begutachtung der Niere AdsFlt-1H behandelte Tiere zeigte schwere histologische Veränderungen im Bereich der reifen juxtamedullär gelegenen Glomeruli. Während der histologische Nierenschnitt unbehandelter und Ad-eGFP behandelte Tiere im H&E Präparat deutlich freie Lumen glomerulärer Kapillaren aufweist, die sich als weiße punktförmige Flächen darstellen (Abb. IV.18 d,e), erscheint das Glomerulum behandelte Tiere stark verdichtet (Abb. IV.18f). Die kapillären Lumen sind überwiegend okkludiert. Die PAS-Reaktion an Schnitten desselben Präparates bestätigt die Beobachtungen des H&E-Schnittes (Abb. IV.18a,b,c). Auch hier zeigten sich eine Verdichtung des Glomerulums und eine Zunahme okkludierter Kapillaren im Präparat sFlt-1 -behandelte Tiere. Da die PAS-Reaktion neutrale Mucopolysaccharide markiert, ist hier eine Verdichtung der Polysaccharidstrukturen im AdsFlt-1H -behandelten Tier zu erkennen, die auf eine verstärkte

Konzentration an extrazellulärer Matrix deuten kann. Die histopathologische Beobachtung im Glomerulum unbehandelter Tiere unterschied sich nicht von der Ad-eGFP behandelten Tiere.

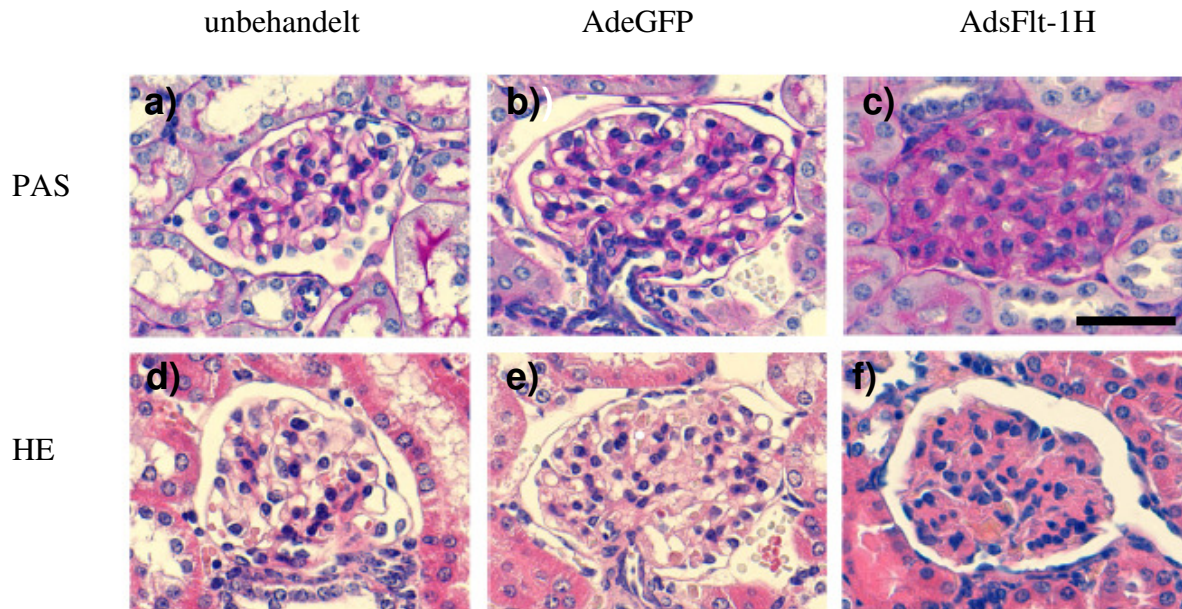


Abb. IV.18: Histologie der Niere nach sFlt-1 Überexpression

Nierenschnitte von unbehandelten Tieren (a,d), von Ad eGFP-(2×10^9 pfu) behandelten Tieren (b, e), und von Ad sFlt-1H-($7,5 \times 10^9$ pfu) behandelten Tieren zeigen jeweils ein für das Präparat repräsentatives Glomerulum. Während die Glomeruli der unbehandelten (a, d) und AdeGFP-behandelten (b, e) Präparate eine Vielzahl freier Lumen in Form von weißen Bereichen zeigen, stellen sich die AdsFlt-1H-behandelten (c, f) Schnitte stark verdichtet dar. Die Kapillarlumen sind kaum nachweisbar und überwiegend verschlossen. In der PAS-Färbung fällt die hohe Konzentration an Mucopolysacchariden auf, die sich im AdsFlt-1H Präparat (c) pink darstellt. PAS- Periodisch-Saure-Schiffs-Reaktion, H&E- Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Der Größenbalken steht für 50µm.

Evaluierung des Schädigungsgrades

Die ausgewählten histologischen Schnitte in Abb. IV.18 zeigen ein für die jeweilige Behandlungsgruppe repräsentatives Glomerulum. Wie in jedem biologischen System wurden auch hier Schwankungen im Grad der Schädigung trotz gleichbleibender applizierter Dosis verzeichnet.

Es galt nun nachzuweisen, dass erhaltene Resultate reproduzierbar sind, und Schwankungen sich im Rahmen der jeweiligen deutlich abgrenzbaren Gruppe bewegen. Zu diesem Zweck wurde aus der ursprünglichen Beurteilung durch Kreuze eine numerische Skala der Schädigungen der einzelnen Tiere erstellt (Tab. IV.1).

Mit Hilfe dieser Skala konnten die individuellen Beurteilungen des Pathologen eingeordnet und ausgewertet werden. Das Ergebnis ist in Abbildung IV.19 dargestellt.

Histologische Beurteilung:	
Kreuz (ursprgl.)	numerisch
0	1
0 / (+)	1,5
0 / +	2
(+)	2,5
(+) / +	3
+ / (+)	3,5
+	4
(+) / ++	4,5
+ / (++)	5
+ / ++	5,5
(++)	6
(++) / ++	6,5
++	7
++ / (+++)	7,5
++ / +++	8
(+++)	8,5
+++	9
+++	9,5

Tab. IV.1: Skala zur Einordnung der histologischen Schädigung

Dargestellt ist die ursprüngliche Beurteilung in Form von Kreuzen, und die angepasste Form durch Zahlen, die eine bessere Auswertung ermöglicht. Dabei entspricht Grad 1 keiner Schädigung, und Grad 9.5 der schwersten Schädigung glomerulärer Strukturen, die auftreten kann.

Bei der histologischen Begutachtung der Niere konnte für AdsFlt-1H behandelte Präparate ein Schädigungsgrad von $7,8 \pm 1,4$ ermittelt werden. Der für Kontrollvirus behandelte Präparate ermittelte Schädigungsgrad unterschied sich mit $1,5 \pm 0,5$ nur geringfügig von dem der unbehandelten Präparate mit $1,4 \pm 0,9$ (Abb. IV.19).

Im Diagramm wird eine klare Abgrenzung zwischen den Kontrollen und der AdsFlt-1H Behandlung hinsichtlich der histopathologischen Veränderung deutlich.

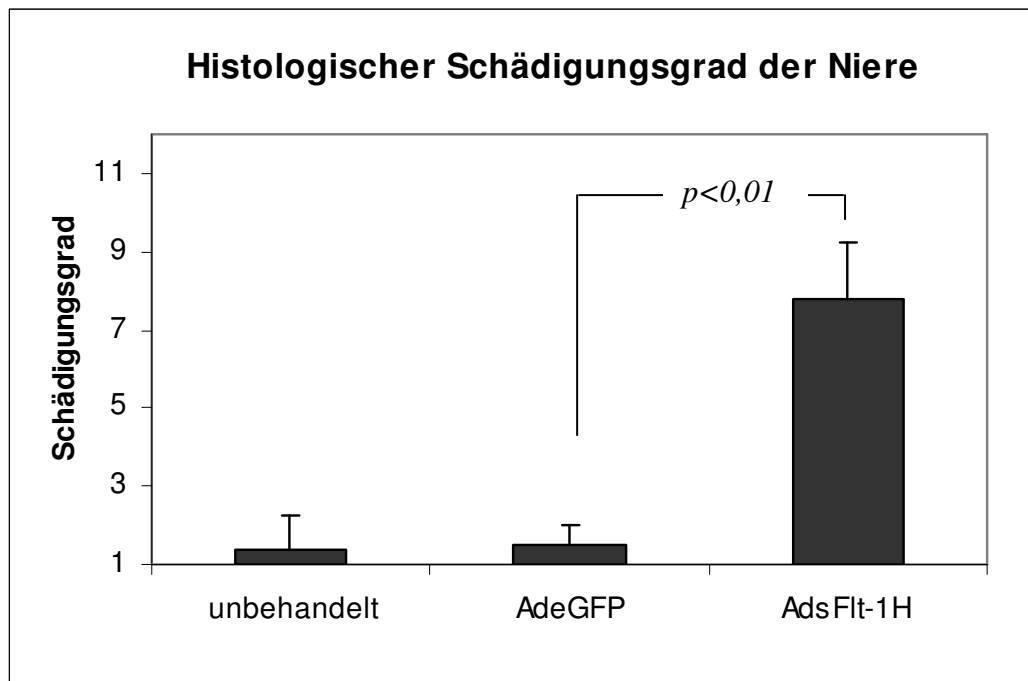


Abb. IV.19: Histologischer Schädigungsgrad der Niere nach sFlt-1 Überexpression

Dargestellt ist die durchschnittliche Schädigung von unbehandelten Tieren (n=14), von AdeGFP-behandelten Tieren (n=6) und von AdsFlt-1H-behandelten Tieren (n=15). Grad 1 = keine Schädigung, Grad 9,5 = massive Schädigung der glomerulären Histologie. Erläuterungen im Text.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Niere.

Diese Untersuchungen wurden durch eine Kooperation mit Herrn Prof. Dr. H. J. Gröne, DKFZ Heidelberg, ermöglicht.

Die Elektronenmikroskopie erlaubt aufgrund der starken Vergrößerung die differenziertere Betrachtung glomerulärer Strukturen, insbesondere die Beschaffenheit der Filtrationsbarriere. Elektronenmikroskopische Aufnahmen unbehandelter Tiere zeigen daher eine intakte glomeruläre Filtrationsbarriere (auch Schlitzmembran). Diese stellt sich im Präparat in Form einer perlenschnurartigen Zellschicht dar, dem fenestrierten Endothel, das entlang der Basalmembran im Inneren der Kapillare liegt, gefolgt von einer dünnen deutlich abgesetzten Basalmembran, und letztendlich begrenzt durch die scharf umrandeten Fortsätze des viszerale Epithels, den Podozyten. In den Übersichtsaufnahmen zeichnen sich die Lumen der verschlungenen glomerulären Kapillarschlingen weiß ab (Abb. IV.20 a, c). Einige der Kapillaren enthalten Erythrozyten. Die Kapillarschlingen sind verknäult und werden in dieser Lage durch das Mesangiom fixiert (Abb. IV.20 b). Die VEGF-sekretierenden Podozyten umschließen die glomerulären Kapillaren und stellen sich im Präparat zum Einen durch ihre außerordentlich großen Kerne, und zum Anderen durch die der Basalmembran anliegenden Fortsätze dar.

Ein anderes Bild zeigt sich in elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Nieren AdsFlt-1H behandelter Tiere. Die Lumen der Kapillaren sind überwiegend verschlossen (Abb. IV.21 a-f). Diese Okklusion ist sowohl durch die Gegenwart von Thromben und zerstörten Erythrozyten, den Fragmentozyten, als auch durch das Auftreten hämolytischen Plasmas gekennzeichnet. Endothelzellen innerhalb der Kapillare als auch Fußfortsätze der Podozyten außerhalb der Kapillare sind kollabiert und fusioniert (Abb. IV.21 b und f, obere Kapillare). Die Schädigung geht soweit, dass sich partiell Endothelzellen von der Basalmembran lösen. Ihre Zelltrümmer werden von Makrophagen phagozytiert, in Energie umgewandelt und diese in Form von Fetttröpfchen in der Kapillare gespeichert. Das Zytoplasma liegt in diesen Kapillaren direkt der Basalmembran an. Trotz der schweren Schäden an der Schlitzmembran und des Gefäßverschlusses zeigen einige Kapillaren unversehrte Podozytenfortsätze (Abb. IV.21 b). Vereinzelt konnten ebenfalls Ablagerungen von Fibrin nachgewiesen werden (Abb. IV.21 f und e), die auf eine schwere Endothelzellschädigung deuten.

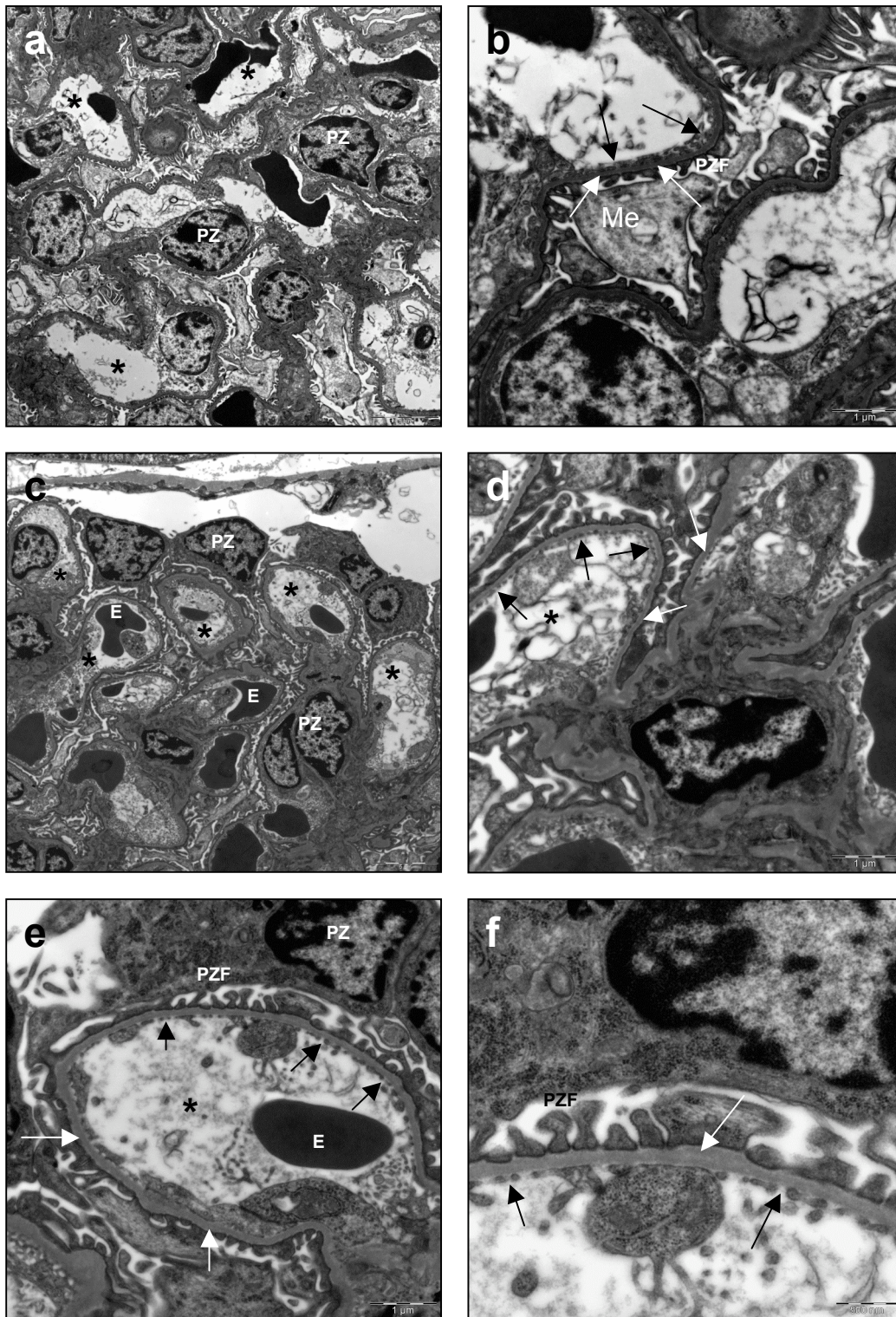


Abb. IV.20: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Niere unbehandelter Tiere

Die Bilder a und c repräsentieren jeweils eine Übersicht eines Teils des Glomerulums mit dem Größenstandard 5 μm . Die Bilder b, d, e und f zeigen die korrespondierende Vergrößerung zur Darstellung der Filtrationsbarriere, wobei die Bilder b, d und e den Größenstandard 1 μm , und f den Größenstandard 0,5 μm zeigen.

PZ-Podozytenkern, PZF-Podozytenfortsätze, E-Erythrozyt, schwarzer * -freie Kapillarlumen, schwarzer Pfeil-fenestriertes Endothel, weißer Pfeil-markiert Basalmembran. Erläuterungen im Text.

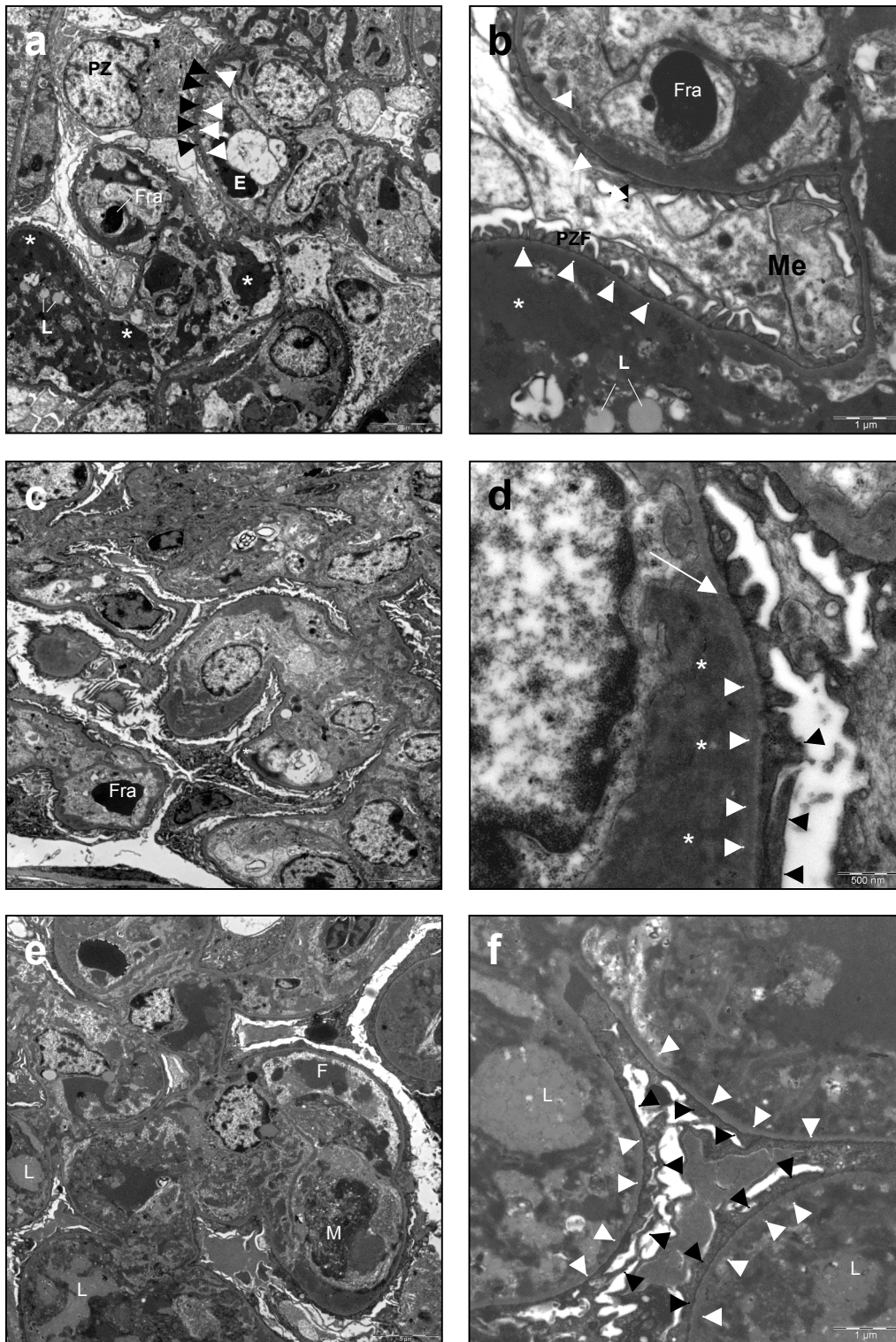


Abb. IV.21: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Niere AdsFlt-1H behandelter Tiere

Die Bilder a, c und e repräsentieren jeweils eine Übersicht eines Teils des Glomerulums mit dem Größenstandard 5µm. Die Bilder b, d und f zeigen die korrespondierende Vergrößerung zur Darstellung der Filtrationsbarriere, wobei die Bilder b und f den Größenstandard 1µm, und f den Größenstandard 0,5µm zeigen. PZ-Podozytenkern, PZF-Podozytenfortsätze, E-Erythrozyt, Fra-Fragmentozyt, Me-Mesangium, L-Lipid, F-Fibrin, M-Makrophage. Weißer * -intraluminale Mikrothromben, schwarze Pfeilspitze-fusionierte oder fehlende Fußfortsätze, weiße Pfeilspitzen-fusioniertes oder fehlendes fenestriertes Endothel, weißer Pfeil-markiert Basalmembran. Erläuterungen im Text.

Nachweis von Fragmentozyten und Erythrozytenstaub

Dieser Nachweis geschah ebenfalls im Rahmen der Kooperation mit Herrn Prof. Dr. H. J. Gröne, vom DKFZ in Heidelberg. Die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung wurde zur Darstellung von Erythrozyten und erythrozytären Zellresten angewandt. Diese heben sich in dieser Färbung orange-rot vom umliegenden Gewebe ab. Im Präparat AdsFIt-1H behandelter Tiere wurden fragmentierte Erythrozyten und Mikrothromben beobachtet (Abb. IV.22 B). Die Fragmentozyten stellten sich dabei orange-rot dar, und waren von gleichfarbigem Erythrozytenstaub in Form kleiner Kügelchen umgeben. Während die roten Blutzellen im Präparat unbehandelter Tiere auf die Kapillaren des Glomerulums beschränkt waren, so zeigte sich im sFIt-1H Präparat eine Streuung der Fragmentozyten und des Erythrozytenstaubes über das gesamte Glomerulum, ein weiterer Hinweis auf die gestörte Morphologie der Schlitzmembran der glomerulären Kapillare.

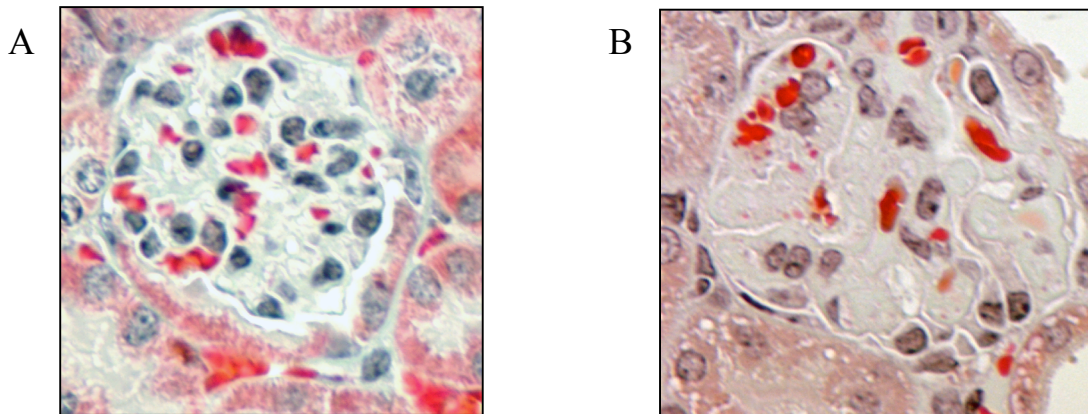


Abb. IV.22: Fragmentozyten und Erythrozytenstaub im Glomerulum AdsFIt-1H behandelter Tiere

A) Glomerulum eines unbehandelten Tieres. Knallrot stellen sich die Erythrozyten als Teil der glomerulären Kapillare dar. **B)** Glomerulum eines AdsFIt-1H behandelten Tieres. Ebenfalls knallrot sind die Erythrozytenfragmente sichtbar, deren kleine Bruchstücke in Form von Erythrozytenstaub nicht mehr auf die glomeruläre Kapillare begrenzt sind. Die Schnitte wurden mit der Masson-Goldner-Trichrome-Färbung behandelt, und sind 40x vergrößert.

Die hier beobachteten charakteristischen Läsionen der Niere markieren eine spezielle Form der glomerulären Endotheliose, die thrombotische Mikroangiopathie. Diese Krankheit ist charakterisiert durch eine Gefäßveränderung der Kapillargefäße verbunden mit akutem Nierenversagen, wie es auch in den vorliegenden Versuchen beobachtet wurde.

Ein weiteres Symptom dieser Krankheit ist ebenfalls die Thrombenbildung im Hirn. Als Folge kann es zu zerebralen Ausfällen kommen, die sich im Verhalten des Individuums äußern. Das Hirn behandelter Tiere wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht auf thrombotische Ereignisse hin untersucht. Da die Tiere sich jedoch äußerlich vollkommen normal verhielten kann eine zerebrale Beteiligung ausgeschlossen werden.

Vergleich von Adenoviruspräparationen am Beispiel der Nierenschädigung

Im Rahmen der Arbeit wurden verschiedene Präparationen des AdsFlt-1 angefertigt, von denen einige zur Austestung und Anwendung kamen. Dabei lagen die Titer der angewandten Präparationen zwischen 1×10^{11} pfu und 1×10^{12} pfu. Ein Vergleich zeigte, dass sich die Viruspräparationen im Grad der Infektiosität und der Intensität der Expression des Zielproteins unterschieden. Die Applikation gleicher Dosierungen unterschiedlicher Präparationen eines Virus offenbarte im Tierversuch schwankende Ergebnisse.

So konnten auftretende Schädigungen nach Behandlung mit $2,5 \times 10^9$ pfu der Präparation Nr.194 und Nr.195 übereinstimmend mit + / ++ (Grad 5,5) bewertet werden (Abb. IV.23 a,e). Die induzierten Effekte nach Applikation von 5×10^9 pfu hingegen lagen mit Präparation Nr.194 bei ++ (Grad 7), mit Präparation Nr.195 bei + / ++ (Grad 5,5), und mit Präparation Nr.196 bei (+) / + (Grad 3) (Abb. IV.23 b, f, k).

Bei Anwendung einer weiteren Viruspräparation *in-vivo* war es demnach nicht möglich nur vom ermittelten Titer der vorangegangenen Präparation auszugehen. Die Menge adenoviraler Partikel die zur Induktion eines Effektes notwendig war, musste für jede Präparation nochmals separat ermittelt werden. Zum Beispiel wurden für die Überexpression des sFlt-1 $7,5 \times 10^9$ pfu der Präparation Nr.196 angewandt; während diese Dosis der Präparation Nr.194 bereits lethale Folgen zeigte. Im umgekehrten Sinne konnte keine renale Schädigung beim Einsatz von $2,5 \times 10^9$ pfu der Präparation Nr.196 erzielt werden, wobei diese Dosis bei Applikation der Präparation Nr.194 oder Nr.195 einen Effekt von + / ++ (Grad 5,5) aufwies. Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse konnten durch die Anwendung der gleichen Viruspräparation erreicht werden. So wurde für die Experimente zur sFlt-1 Überexpression überwiegend Präparation Nr.196 mit einer Dosis von $7,5 \times 10^9$ pfu eingesetzt, und eine durchschnittliche histologische Schädigung von $7,8 \pm 1,4$ erzielt.

Die korrespondierenden Leberpräparate weisen Schäden auf, die sehr wahrscheinlich auf den adenoviralen Befall zusammen mit der Expression des VEGF-Inhibitors sFlt-1 zurückzuführen sind. Eine kurze Erläuterung der Leberpathohistologie in unbehandelten, AdeGFP-, AdVEGF- und AdsFlt-1-behandelten Tieren wurde bereits im Kapitel IV.3.1.3 beschrieben.

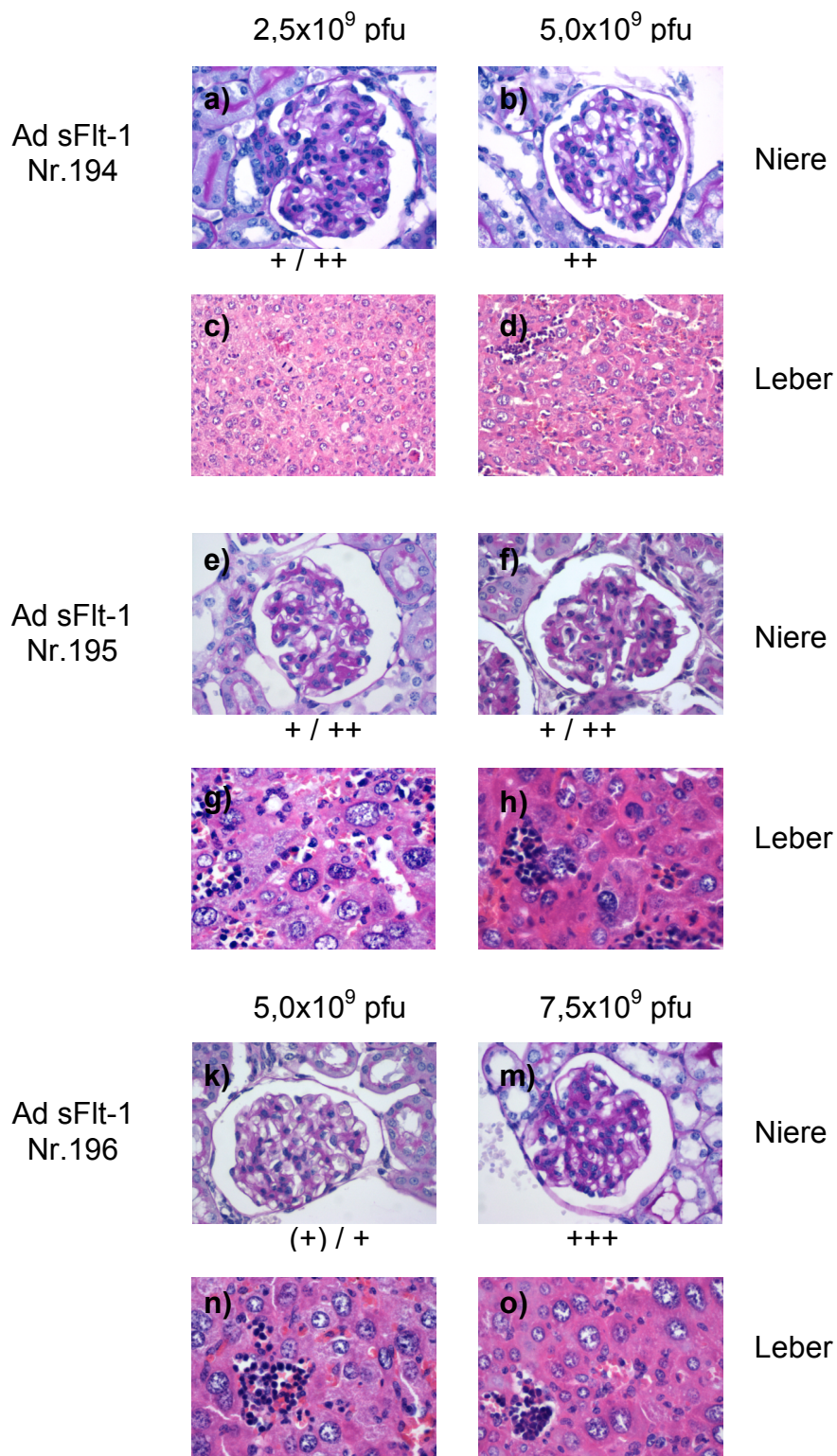


Abb. IV.23: Histologie von Niere und Leber: Vergleich von Adenoviruspräparationen

Präparate aus der Behandlung mit gleichen adenoviralen Konzentrationen, jedoch unterschiedlichen Viruspräparationen wurden gegenübergestellt. Die Schnitte wurden HE gefärbt. Alle Präparate in 40x Vergrößerung, außer c) und d) in 20x Vergrößerung. Erläuterungen im Text.

3.1.5 Veränderte Albuminkonzentration im Harn nach sFlt-1 Überexpression

Eine erhöhte Proteinkonzentration im Harn kann auf vielfältige Ursachen zurückgeführt werden, wie ein Schaden an den Tubuli oder den Glomeruli der Niere, als auch eine Infektion der ableitenden Harnwege. Eremina et al. demonstrierten bereits im transgenen Rattenmodell, dass bei Schädigung des renalen Filters die Proteinkonzentration im Harn, speziell von Albumin, stark erhöht ist (Eremina et al. 2003). Um herauszufinden, ob sich die Schädigung der Niere in Form einer erhöhten Proteinkonzentration im Urin widerspiegelt, wurde der Proteingehalt im Urin behandelter und unbehandelter Mäuse verglichen. Der Harn einzelner Mäuse wurde über einen Zeitraum von 24h mit Hilfe von Stoffwechselkäfigen gesammelt, um so auf vergleichbare Werte zurückgreifen zu können.

Nachweis von Gesamtprotein im Harn

Da Methoden zur Bestimmung des Gesamtproteins im Urin, wie die Biuret-Reaktion (BCA-Assay) oder der Bradford-Test, aufgrund der interferierenden Substanzen Harnsäure und Creatinin hier nicht angewendet werden konnten, wurde die Silberfärbung zur Darstellung des totalen Proteingehaltes gewählt. Dafür wurden je 1 μ L des unverdünnten 24h-Harns auf ein reduzierendes 10% SDS-PA-Gel geladen, und nach erfolgter Auftrennung die Proteine durch einen Silberniederschlag markiert. Die Intensität des sich braun darstellenden Niederschlags korreliert mit der nachgewiesenen Proteinmenge.

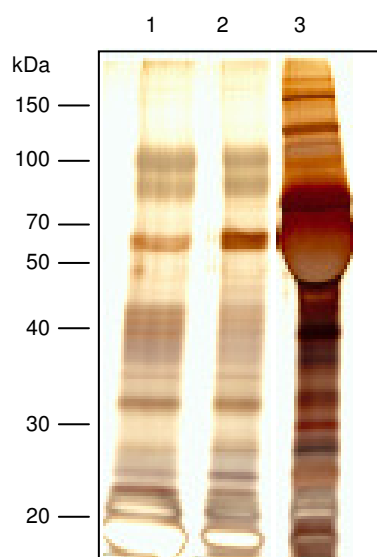


Abb. IV.24: Nachweis von Gesamtprotein im Harn nach sFlt-1 Überexpression

Je 1 μ L einer repräsentativen murinen Harnprobe wurde über ein reduzierendes SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mittels Silberfärbung markiert. Spur1: Harn einer unbehandelten Maus, Spur2: Harn einer Ad-eGFP behandelten Maus, Spur3: Harn einer Ad-sFlt-1 behandelten Maus. Silberfärbung.

Der Vergleich der Proben zeigt eine intensive Färbung im Harn des AdsFlt-1H behandelten Tieres (Abb. IV.24). Im Harn des unbehandelten sowie des Ad-eGFP behandelten Tieres sind die Signale vergleichsweise schwach. Auffallend ist die starke Bande auf einer Höhe von 70kDa, die in allen drei Proben nachgewiesen werden konnte, im AdsFlt-1H behandelten Tier jedoch die Probe dominierte. Diese Beobachtungen konnten in weiteren Experimenten reproduziert werden (Abb. IV.25). Die Ergebnisse zeigen, dass im Harn AdsFlt-1H behandelter Tiere die Proteinkonzentration stark erhöht ist.

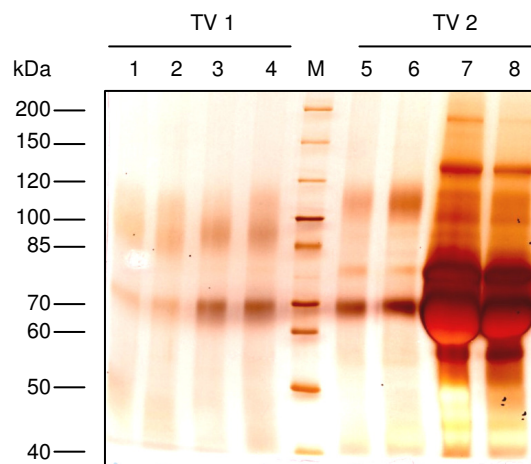


Abb. IV.25: Nachweis von Gesamtprotein nach sFlt-1 Überexpression (weitere Proben). Je 1 μ L einer repräsentativen murinen Harnprobe wurde über ein reduzierendes SDS-PA-Gel aufgetrennt, und die Proteine mittels Silberfärbung markiert. Zwei unterschiedliche Tierversuche wurden beispielgebend auf Gesamtprotein hin untersucht: TV1-TV2. Die Spuren 1,2,5 und 6 zeigen Harnproben unbehandelter Tiere. Spur 3+4: Harn Ad-eGFP behandelter Mäuse; Spur 7+8: Harn AdsFlt-1H behandelter Mäuse; M: Proteinmarker. Silberfärbung

Nachweis von Albumin im Harn

Das Plasmaglobulin Albumin hat eine Größe von 66,2kDa und repräsentiert 60% der im Blut vorkommenden Proteine. Es ist unter anderem für die Erhaltung des kolloidosmotischen Druckes verantwortlich, indem es Wasser bindet und so dessen Austritt in das Gewebe verhindert. Im gesunden Zustand ist Albumin vereinzelt im Harn nachweisbar, wird jedoch fast ausschließlich über den glomerulären Filter im Blut zurückgehalten. Da eine verstärkte Konzentration an Albumin im Harn einen unmittelbaren Zusammenhang zur Schädigung der glomerulären Schlitzmembran darstellt, wurde mit dem Hintergrund der Ergebnisse von Histologie und Silberfärbung der Harn qualitativ und quantitativ auf Albumin hin untersucht (Abb. IV.26.). Die ELISA-Messungen ergaben eine Albuminkonzentration in den Kontrollgruppen von $0,041 \pm 0,02$ mg/mL in unbehandelten Tieren, und eine vergleichbare Konzentration von $0,071 \pm 0,03$ mg/mL in Ad-eGFP behandelten Tieren. Der Harn AdsFlt-1H behandelter Tiere wies mit $42,5 \pm 5,2$ mg/mL stark erhöhte Albuminwerte auf. Vereinzelt

wurden Werte wie 97mg/ml detektiert, die jedoch nicht in die Kalkulation mit einbezogen wurden.

Der Nachweis der stark erhöhten Albuminkonzentration im Harn AdsFlt-1H behandelter Tiere bestätigt die Vermutung, dass es sich bei dem in der Silberfärbung beobachteten intensiven Signal um das Plasmaprotein Albumin handelt.

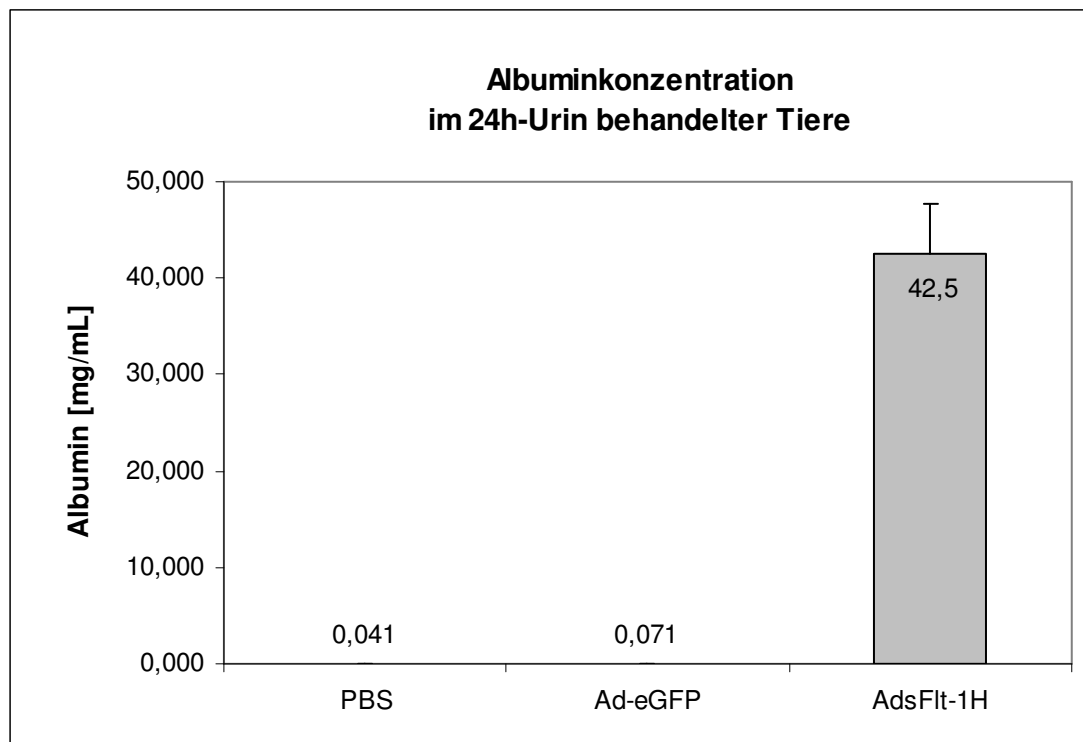


Abb. IV.26: Nachweis von Albumin im 24h-Harn nach sFlt-1 Überexpression

Über ELISA-Messungen wurde im Harn unbehandelter Tiere (n=6), Ad-eGFP behandelte Tiere (n=2) und AdsFlt-1H Tiere (n=4) murines Albumin quantitativ nachgewiesen.

Creatinin-Clearance

Zur näheren Untersuchung des glomerulären Schadens wurde stichprobenartig die Creatinin-Clearance bestimmt (in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Gretz, Universität Mannheim). Creatinin ist ein kataboles Produkt aus dem Muskelstoffwechsel. Da es durch die Niere ausschließlich filtriert und nicht partiell rückresorbiert wird, erlaubt das Verhältnis von Plasma-Creatinin zu Harn-Creatinin in Abhängigkeit vom Harnvolumen eine Aussage zur glomerulären Filtrationsrate und damit ebenfalls zur Nierenfunktion. Die Creatinin-Clearance betrug bei AdsFlt-1H behandelten Tieren $13,9 \pm 5,3$ L im Vergleich zu 1,46 L im unbehandelten Tier (Abb. IV.27). Diese Ausscheidungsrate von Creatinin demonstriert eine erhöhte glomeruläre Filtrationsrate bei AdsFlt-1H behandelten Tieren, und deutet damit auf eine verstärkte Permeabilität der Schlitzmembran.

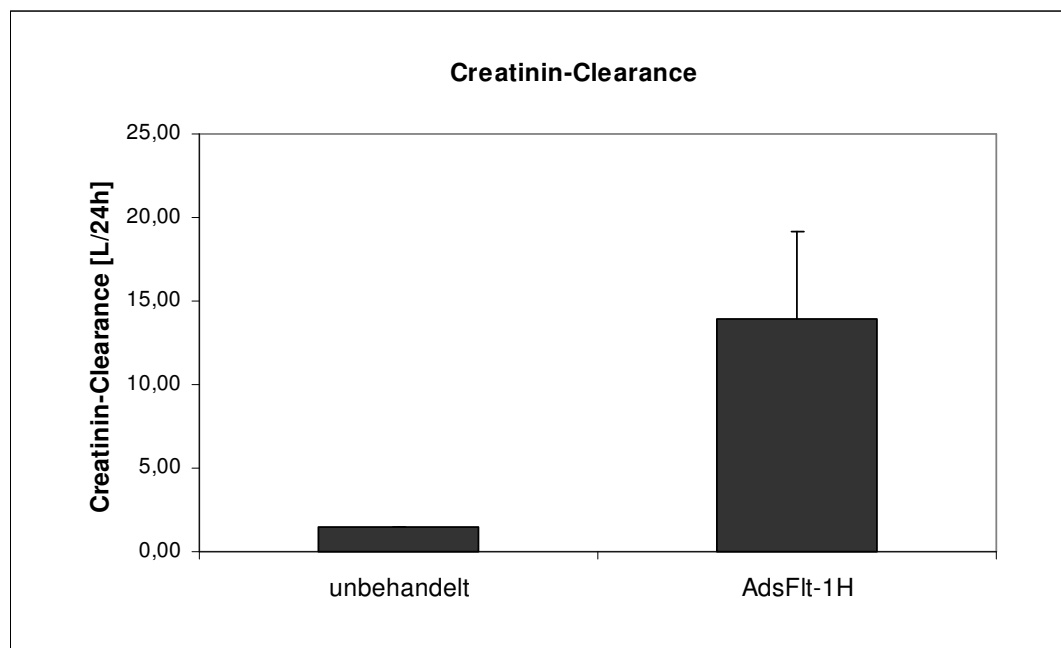


Abb. IV.27: Creatinin-Clearance nach sFlt-1 Überexpression

Die stichprobenartige Bestimmung der Creatinin-Clearance ist dargestellt. Verglichen wird der unbehandelte Zustand (n= 1) und der AdsFlt-1H behandelte Zustand (n=2)

Es konnte gezeigt werden, dass im Urin AdsFlt-1H behandelter Mäuse die Proteinkonzentration stark erhöht ist. Dabei stellt einen Großteil des Gesamtproteins Albumin dar, das als Leitprotein einer Nierenschädigung gilt. Die stichprobenartige Bestimmung der Creatinin-Clearance gibt einen Hinweis auf eine möglicherweise erhöhte Permeabilität der Schlitzmembran. Diese Ergebnisse deuten auf eine Störung der Nierenfunktion hin.

3.1.6 Veränderung des Blutdrucks nach sFlt-1 Überexpression

Die Regulation des Blutdrucks erfolgt über verschiedene Systeme, wie das Renin-Angiotensin-System, oder die Regulation durch Barorezeptoren (vegetatives Nervensystem). Das die Gefäße auskleidende Endothel ist ebenfalls beteiligt. Im Endothel wird durch VEGF-A die Freisetzung von Stickstoffmonoxid angeregt, dass eine Relaxation der Gefäßmuskulatur bewirkt und damit eine Senkung des Blutdrucks. Verminderte VEGF-A -Spiegel haben somit einen Anstieg des Blutdrucks zur Folge.

Der Einfluß der sFlt-1-Überexpression auf den Blutdruck wurde an einzelnen Tieren beispielhaft untersucht (Kooperation Dr.V.Gross, Charité Berlin). Den Tieren wurde dafür ein Transmitter implantiert, der die Pulswelle der Halsschlagader misst, und an den Empfänger weiterleitet. Die Tiere waren so einer doppelten Belastung ausgesetzt. Aus diesem Grund musste die Dosis applizierter AdsFlt-1H von $7,5 \times 10^9$ pfu auf $5,5 \times 10^9$ pfu reduziert werden, um so den stabilen Zustand zwischen der außerordentlich hohen Belastung des Organismus durch das Implantat und die erforderliche adenovirale Dosis zu gewährleisten. Die telemetrischen Daten wurden ab dem Zeitpunkt der Implantation des Senders erfasst. Nach einem Zeitraum von drei bis fünf Tagen stabilisierte sich der Kreislauf, so dass zehn Tage nach der Operation die rekombinanten Adenoviren injiziert werden konnten. Dabei wurden sowohl die Werte der letzten drei Tage vor der Adenovirusapplikation, als auch die der letzten drei Tage des Experimentes jeweils gemittelt und zur Auswertung herangezogen.

Die untersuchten Tiere zeigten übereinstimmend eine Zunahme des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) nach adenoviraler Infektion mit AdsFlt-1H (Abb. IV.28). So konnte bei Tier 1 (AdsFlt1-1H_1) ein Anstieg um 19mmHg ($135 \pm 0,58$ vs 116 ± 0 mmHg), bei Tier 2 (AdsFlt-1H_2) um 34mmHg (147 ± 1 vs $113 \pm 0,58$ mmHg), und bei Tier 3 (AdsFlt-1H_3_ab) ein Anstieg um 69mmHg ($192 \pm 3,1$ vs $123 \pm 7,1$ mmHg) beobachtet werden. Der Blutdruck des Kontrolltieres hingegen verhielt sich gegensätzlich, und nahm nach AdeGFP Applikation um 10mmHg ($106 \pm 0,57$ vs $116 \pm 1,2$ mmHg) ab.

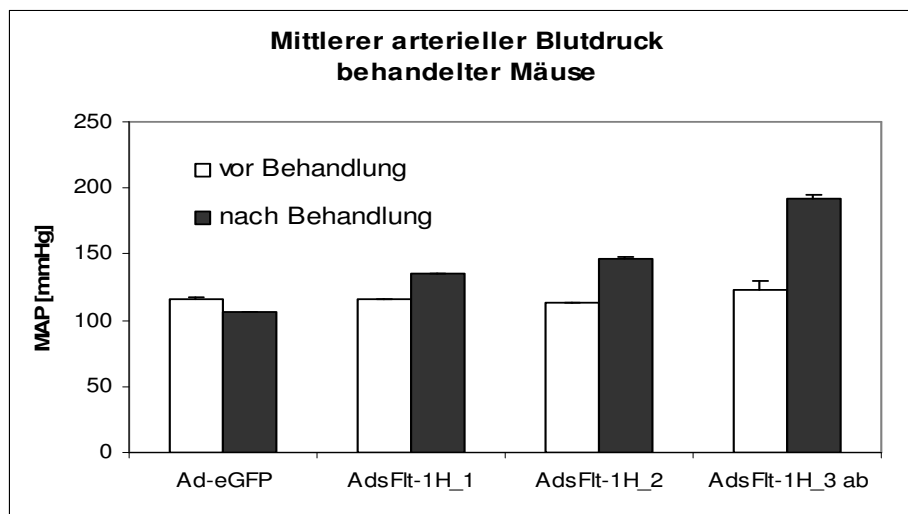


Abb. IV.28: Mittlerer arterieller Blutdruck nach sFlt-1 Überexpression

Mäuse wurden mit Ad-eGFP und AdsFlt-1H behandelt: Tier1: AdsFlt-1H_1; Tier2: AdsFlt-1H_2; Tier3: AdsFlt-1H_3_ab und zusätzlich Applikation von 2x 1180ng anti-Flt-1 im Abstand von 3 Tagen.

Der Verlauf der telemetrischen Messungen ist in Abbildung IV.29 dargestellt. Die Messungen beginnen am Tag der Implantation des Senders, werden durch die Adenovirusapplikation unterbrochen (blaue Markierung), und enden zehn Tage später mit dem Abschluß des Experimentes. Es ist sowohl der systolische (rot) als auch der diastolische (schwarz) Pulswellenverlauf abgebildet. Die Oszillation des Graphen reflektiert den Tag- und Nachtrhythmus der Tiere, wobei Mäuse tagsüber ruhen und ihr Blutdruck dann diesem Zustand entsprechend niedrig ist.

Der Blutdruck der drei AdsFlt-1H behandelten Mäuse steigt sehr schnell (Abb. IV.29B). Schon einen halben Tag nach Applikation der Adenoviren ist eine Zunahme des Blutdrucks im Diagramm zu erkennen. So zeichnet sich die Differenz zwischen dem Wert nach Behandlung am Ende des Experimentes, und vor der Behandlung deutlich ab. Sie beträgt beim ersten Tier 19mmHg Systole (149 vs 130 mmHg) bzw. 19mmHg Diastole (119 vs 100

mmHg), beim zweiten 37mmHg Systole (165 vs 128mmHg) bzw. 35mmHgDiastole (132 vs 97mmHg) und beim dritten untersuchten Tier 68mmHg Systole (203 vs 135mmHg) bzw. 72mmHg Diastole (183 vs 111mmHg).

Das dritte Tier (AdsFlt-1H_3_ab) erhielt zusätzlich im Rahmen von Komplexierungsexperimenten eine zweimalige Dosis an Flt-1 Antikörper, die sich jedoch nicht blutdrucksenkend auswirkte, wie angenommen (Abb. IV.29B). Auf diese Experimente zur Komplexierung des sFlt-1 in der Zirkulation wird in Kapitel IV.3.2.8 näher eingegangen.

Diese Versuche zeigten einen Anstieg des Blutdrucks bei sFlt-1 behandelten Tieren, der eine Folge der inhibierten VEGF-A -Aktivität sein kann. VEGF-A steuert die Freisetzung des vasodilatierend wirkenden Stickstoffmonoxid über die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase. Die Blockierung dieses Wachstumsfaktors kann sich demzufolge blutdrucksteigernd auswirken.

Da diese Versuche an einzelnen Tieren durchgeführt wurden, stellen sie Stichproben dar und können so nur zur Bestätigung vorangegangener Untersuchungen herangezogen werden.

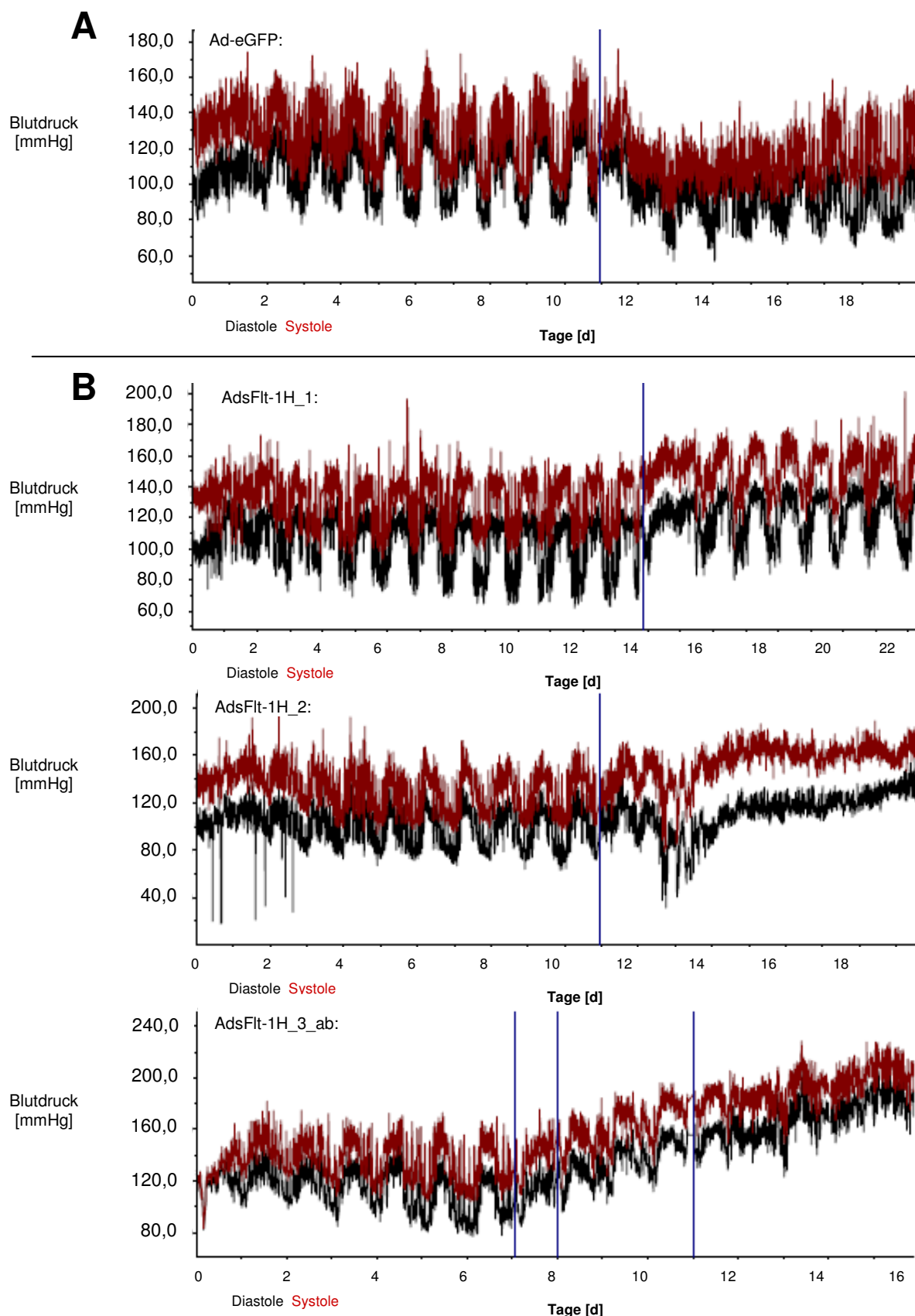


Abb. IV.29: Blutdruck-Verlaufskurven nach sFlt-1 Überexpression

A) Blutdruckverlauf einer Ad-eGFP behandelten Maus **B)** Blutdruckverlauf von AdsFlt-1H behandelten Tieren: Tier1: AdsFlt-1H_1; Tier2: AdsFlt-1H_2; Tier3: AdsFlt-1H_3_ab: zusätzl. 2360ng anti-Flt-1; rot – Systole; schwarz – Diastole; blaue Markierung – Adenovirusapplikation, AdsFlt-1H_3_ab: Adenovirusapplikation und danach zweimalige Antikörperapplikation

3.1.7 Überexpression von sFlt-1 in trächtigen Tieren

Um den Einfluß der sFlt-1 Überexpression auf die Plazentaentwicklung zu betrachten wurden ebenfalls trächtige Tiere examiniert, da Präeklampsie eigentlich den Zustand der Gestation impliziert. Da bereits im Rattenmodell gezeigt wurde, dass die Überexpression von sFlt-1 sowohl bei trächtigen als auch bei nicht trächtigen Tieren die gleichen Symptome induziert, bestand aus ethischen Gründen keine Notwendigkeit in allen Versuchen trächtige Tiere einzusetzen (Maynard et al. 2003).

Der experimentelle Ablauf glich dem der anderen Versuche. Die rekombinanten Adenoviren wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Trächtigkeit appliziert. Es wurde der Einfluß in der frühen Gestation an Tag 4 und Tag 5, sowie der späteren Gestation an Tag 8 und Tag 9 stichprobenartig untersucht.

In der frühen Gestation konnten in einem Versuch der Eindruck erweckt werden, die Schwangerschaft wurde abgebrochen. Das Gebärmutterhorn von vier der sechs plug-positiven behandelten Tiere zeigte plazentaähnliche Entwicklungen, die jedoch bei weitem nicht dem Stand der Trächtigkeit entsprachen. Die übrigen zwei Tiere entwickelten keine Anzeichen einer Gestation. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die trächtigen Tiere eine geringere Nierenschädigung aufwiesen als nicht trächtige, gleich behandelte Tiere. In einer Wiederholung dieses Versuchs konnten diese Beobachtungen nicht bestätigt werden. Die Embryonen sahen gesund aus, und unterschieden sich nicht von denen der unbehandelten Tiere. Die Nieren zeigten die gleiche Intensität der Schädigung wie sie bei nicht trächtigen, mit ähnlichen Konzentrationen an sFlt-1 behandelten Tieren beobachtet wurde.

Die adenovirale Überexpression des sFlt-1 in der späten Gestation schien keinen Einfluß auf die Entwicklung der Embryonen zu haben.

Da die Ergebnisse dieser Versuche recht widersprüchlich waren, und die Tendenz zu einem Schadensbild nicht hinreichend gezeigt werden konnte, wurden keine weiteren Versuche zu dieser Thematik durchgeführt.

3.2. Blockierung der induzierten sFlt-1 Aktivität im Präeklampsie-Modell

Die bei sFlt-1 Überexpression erzielte Induktion präeklampsischer Symptome lässt auf die Vermutung schließen, dass diese Veränderungen Ausdruck der hohen Konzentration an sFlt-1 in der Zirkulation, und der damit verbundenen inhibitorischen Wirkung auf lokal freigesetztes VEGF-A und damit auf das Endothel sind. Der letztendliche Beweis dieser Annahme kann nur getroffen werden wenn gezeigt wird, dass der induzierte Effekt auch reversibel ist. Es muss also demonstriert werden, dass tatsächlich sFlt-1 im Rahmen dieses Modells für die auftretenden pathologischen Veränderungen verantwortlich ist, und sich die Effekte bei Inhibierung dieses Rezeptors vermindern.

Die folgenden Versuche sollen das belegen. Die Blockierung der sFlt-1 Aktivität wurde hierbei zum Einen durch Co-Expression des Liganden VEGF-A₁₆₅ und zum Anderen durch Applikation des neutralisierenden Flt-1 Antikörpers KM1750 erzielt. Als wichtige Voraussetzung galt hierbei die Bindungsfähigkeit von humanem VEGF an murines sFlt-1. Aus diesem Grund wurden als erstes Bindungsstudien zur adenoviralen Co-Expression von sFlt-1 und VEGF, und zur Bindung des sFlt-1 durch KM1750 durchgeführt, die die Grundlage für spätere Tierversuche zur Neutralisierung der sFlt-1 induzierten Effekte bildeten.

3.2.1 Bindungsstudien zur Komplexbildung von adenoviral exprimiertem sFlt-1 durch co-exprimiertes VEGF-A nach Infektion von A549-Zellen

Im Vorfeld der Versuche stand die Frage, ob murines sFlt-1 durch co-exprimiertes humanes VEGF-A₁₆₅ tatsächlich gebunden werden kann. Die Bindung des Liganden an den löslichen Rezeptor sollte dessen Interaktion mit weiteren Liganden unterbinden und ihn somit neutralisieren. Für diese Reaktion muß ein Reaktionspartner, in diesem Falle der Ligand, im Überschuß vorliegen, also beide Reaktionspartner sich in einem bestimmten Verhältnis zueinander befinden. Um diesen Fragen auf den Grund zu gehen, wurden *in-vitro* Versuche zur Komplexbildung durchgeführt. Zur Vereinfachung wird im Folgenden der AdmsFlt-1mFc als *AdsFlt-1*, das murine sFlt-1mFc als *sFlt-1*, der AdVEGF-A₁₆₅-eGFP als *AdVEGF*, und das VEGF-A₁₆₅ als *VEGF* bezeichnet.

Zunächst wurden für die Versuche unterschiedliche Verdünnungen der sFlt-1- und VEGF-Adenoviren hergestellt, repräsentativ für eine Auswahl an MOIs (multiplicity of infection = Viruspartikel/Zelle: 10, 20, 40, 50, 100) bei entsprechend zuvor ermittelter Zellzahl.

Ausgehend von diesen Verdünnungen erfolgte die Infektion von A549-Zellen zum Einen separat mit AdsFlt-1 und AdVEGF (Monoinfektion), und zum Anderen parallel als Co-Infektion. Dabei wurde eine aufsteigende Konzentrationsreihe von AdsFlt-1 (MOI 10, 20, 40, 50, 100) mit AdVEGF MOI 10, und eine weitere mit AdVEGF MOI 20 co-infiziert. Im gleichen Sinne wurden aufsteigende AdVEGF-Reihen mit AdsFlt-1 MOI 10 und AdsFlt-1 MOI 20 co-infiziert, so dass letztendlich sechs unterschiedliche Verdünnungsreihen vorlagen. Von diesen Verdünnungsreihen wurden sowohl die Konzentrationen an freiem sFlt-1 als auch die an freiem VEGF in den einzelnen Proben bestimmt. Die angewandten ELISA-Kitsysteme erkennen überwiegend freies VEGF-A und freies Flt-1 (Maynard et al. 2003).

Auf diese Weise sollte eine Vorstellung der Konzentration an exprimiertem Protein durch die Adenoviren gewonnen, und gleichzeitig die Interaktion der Proteine bei Co-Expression betrachtet werden. Die Ergebnisse erlauben dann Rückschlüsse auf das Verhältnis der Adenoviren das nötig ist, um die sFlt-1 Aktivität zu blockieren.

AdsFlt-1-Konzentrationsreihe (MOI 10, 20, 40, 50, 100, 150)

Die Monoinfektion mit AdsFlt-1 (MOI 10, 20, 40, 50, 100, 150) zeigte einen Anstieg der Proteinkonzentration von ~0ng/mL bei MOI 10, auf $2.533,6 \pm 457,6$ ng/mL bei MOI 150 und damit die erwartete positive Korrelation zwischen eingesetzten Adenoviren und exprimiertem und freigesetztem Protein (Abb. IV.30). Da in folgenden Co-Expressionsversuchen mit AdVEGF bei AdsFlt-1 MOI 10 eine Konzentration von $34,8 \pm 2,7$ bzw. $22,3 \pm 0,28$ ng/mL gemessen wurde, ist davon auszugehen, dass die Konzentration unterhalb der Detektionsgrenze in der Einzelinfektion mit AdsFlt-1 MOI 10 einen Fehler darstellt, und nicht der wahren Konzentration entspricht. Die Differenz zwischen den Werten der Monoinfektion bei MOI 100 und MOI 150 ist mit 34,1ng/mL sehr gering, im Vergleich zu der Differenz zwischen MOI 50 und MOI 100 mit 1.533,6ng/mL. Das zeigt, dass die Sättigung der Expression für dieses Protein durch die A549-Zellen bei MOI 100 schon erreicht ist.

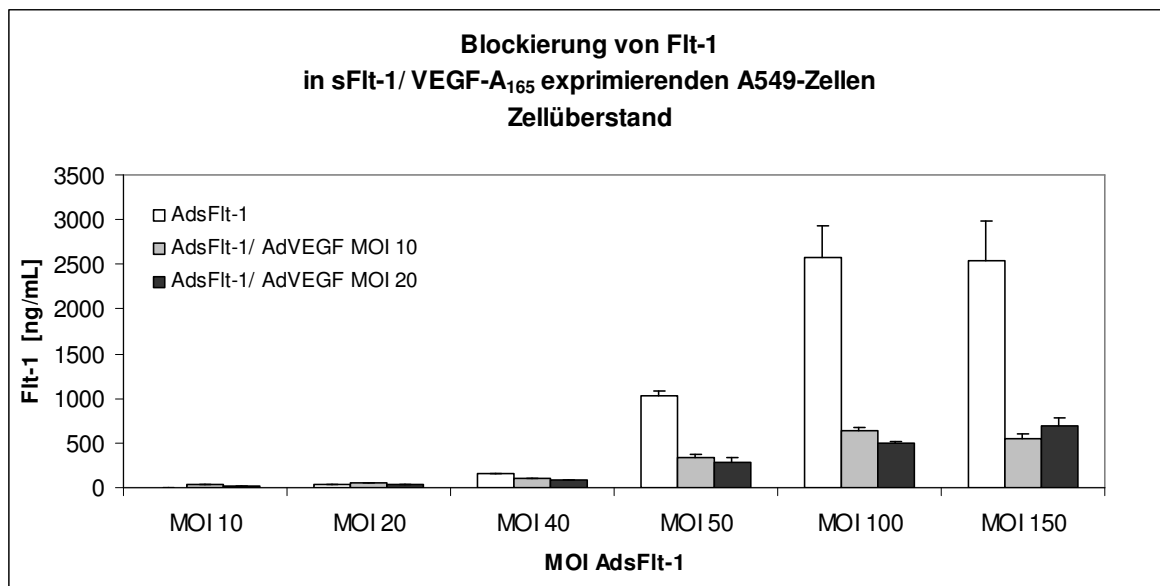


Abb. IV.30: Flt-1 Konzentration im Überstand adenoviral infizierter Zellen mit ansteigender Verdünnungsreihe an AdsFlt-1. Die Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen an AdsFlt-1 infiziert. Dabei wurden die Zellen als erstes mit AdsFlt-1 separat infiziert (weiße Balken), als zweites mit AdVEGF MOI 10 co-infiziert (hellgrauer Balken), und als drittes mit AdVEGF MOI 20 co-infiziert (schwarzer Balken). Die dargestellten Werte sind repräsentativ für Mittelwerte aus zwei Experimenten.

Die Co-Expression in der AdsFlt-1 Konzentrationsreihe (MOI 10, 20, 40, 50, 100, 150) mit AdVEGF MOI 10 zeigt eine deutliche Reduktion der sFlt-1 Konzentration im Vergleich zu den Werten der Einzelinfektion. Dieser Trend ist schon bei AdsFlt-1 MOI 40 sichtbar, und verstärkt sich mit zunehmender MOI. Die Messung der Proben von AdsFlt-1 MOI 50 ergab die Reduktion auf ein Drittel, von $1.034,1 \pm 42,6 \text{ ng/mL}$ auf $344,7 \pm 30,8 \text{ ng/mL}$, und die der Proben von AdsFlt-1 MOI 100 die Reduktion auf ein Viertel der bei Einzelinfektion exprimierten Proteinmenge, von $2.567,7 \pm 359,6 \text{ ng/mL}$ auf $642,85 \pm 39,2 \text{ ng/mL}$. Die Co-Expression der AdsFlt-1 Konzentrationsreihe mit AdVEGF MOI 20 resultierte ebenfalls in einer massiven Reduktion der Flt-1-Konzentration, verglichen mit Werten der Einzelinfektion. Allerdings fielen die Werte ähnlich wie die der kleineren Blockierungsstufe AdVEGF MOI 10 aus. So zeigt die Co-Expression mit AdVEGF MOI 20 bei AdsFlt-1 MOI 50 eine Konzentration von $289,5 \pm 39,5 \text{ ng/mL}$, und bei AdsFlt-1 MOI 100 eine Konzentration von $495 \pm 23,3 \text{ ng/mL}$. Das kann darauf zurückgeführt werden, dass die Menge an VEGF bei AdVEGF MOI 10 ausreichend ist um den überwiegenden Teil an freiem sFlt-1 zu binden.

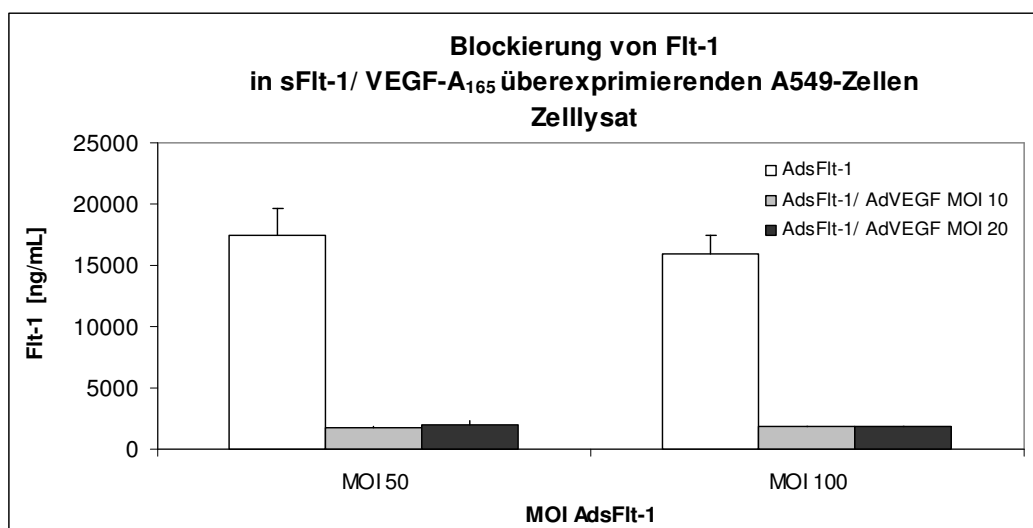


Abb. IV.31: Flt-1 Konzentration im Zelllysate adenoviral infizierter Zellen mit ansteigender Verdünnungsreihe an AdsFlt-1. Die Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen an AdsFlt-1 infiziert. Dabei wurden die Zellen als erstes mit AdsFlt-1 separat infiziert (weiße Balken), als zweites mit AdVEGF MOI 10 co-infiziert (hellgrauer Balken), und als drittes mit AdVEGF MOI 20 co-infiziert (schwarzer Balken). In dieser Abbildung sind nur die Zelllysate von AdsFlt-1 MOI 50 und MOI 100 gezeigt. Die dargestellten Werte sind repräsentativ für Mittelwerte aus zwei Experimenten.

Um zu sehen ob sich dieser Trend im Zelllysate der Proben fortsetzt, wurde in ausgewählten Zelllysaten ebenfalls die Flt-1 Konzentration bestimmt (Abb. IV.31). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Flt-1 Konzentration in co-infizierten Proben abfällt. Die Konzentrationsunterschiede zwischen den untersuchten Zelllysaten MOI 50 und MOI 100 waren allerdings sehr gering. So wurde im Zelllysate der Monoinfektion bei MOI 50 ein Wert von 17.450 ± 2.192 ng Flt-1/mg Gesamtprotein festgestellt, und bei MOI 100 nur noch 15.900 ± 1.555 ng/mL/mgProtein an sFlt-1. Die Co-Expression mit AdVEGF MOI 10 ergab bei MOI 50 einen Wert von 1.753 ± 0.118 ng Flt-1/mg Gesamtprotein und bei MOI 100 eine Konzentration von 1.868 ± 0.36 ng Flt-1/mg Gesamtprotein. Das ist ein Neuntel der bei Monoinfektion gemessenen Konzentration und zeigt einen Rückgang um rund 89%. Die Co-Expression mit AdVEGF 20 erbrachte mit 2.029 ± 0.323 ng Flt-1/mg Gesamtprotein bei MOI 50 und $1.884,5 \pm 0.64$ ng Flt-1/mg Gesamtprotein bei MOI 100 ähnliche Werte wie die Co-Expression mit AdVEGF MOI 10.

Diese Werte zeigen eine Stagnierung, und deuten so die Sättigung der Expression dieses Proteins an, die sich im Überstand allerdings erst beim Vergleich von MOI 100 und MOI 150 zeigt (vgl. Abb. IV.30 und IV.31). Der im Zellüberstand beobachtete Trend bestätigte sich bei der Messung der Zelllysate. Dies bedeutet auch, dass die Komplexbildung nicht erst im Überstand, analog im Serum, sekretiert wird, sondern bereits in der Zelle stattfindet. Da beide Proteine sekretiert werden, erfolgt die Komplexbildung bereits innerhalb des sekretorischen Weges.

Die Messung von VEGF in diesen Proben ergab einen reziproken Trend zur Messung von Flt-1 (Abb. IV.32). Während VEGF in den mono-infizierten Proben der AdsFlt-1 Konzentrationsreihe nicht nachweisbar war, zeigte sich in den co-infizierten Proben von AdsFlt-1 mit steigender MOI ein Abfall der VEGF-Konzentration. Da der Kontrollüberstand nicht infizierter A549-Zellen eine VEGF-Konzentration von 0,72ng/mL aufwies, könnte dieser geringe Anteil an endogenem VEGF in mono-infizierten Proben durch überexprimiertes sFlt-1 komplexiert sein.

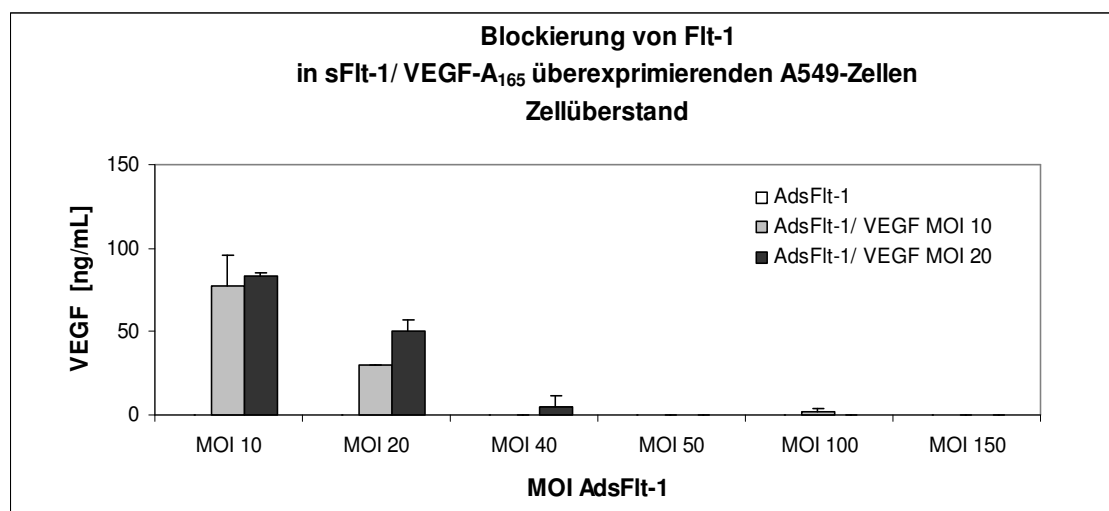


Abb. IV.32: VEGF- Konzentration im Überstand adenoviral infizierter Zellen mit ansteigender Verdünnungsreihe an AdsFlt-1. Die Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen an AdsFlt-1 infiziert. Dabei wurden die Zellen als erstes mit AdsFlt-1 separat infiziert (weiße Balken), als zweites mit AdVEGF MOI 10 co-infiziert (hellgrauer Balken), und als drittes mit AdVEGF MOI 20 co-infiziert (schwarzer Balken). Die dargestellten Werte sind repräsentativ für Mittelwerte aus zwei Experimenten.

Bei der Co-Expression von AdVEGF MOI 10 in der Konzentrationsstufe AdsFlt-1 MOI 10 lag die Konzentration von VEGF mit $77,8 \pm 18 \text{ ng/mL}$ nur 22,7% unter der der AdVEGF-Einzelninfektion ($100,6 \pm 3,4 \text{ ng/mL}$), obwohl beide Adenoviren zu gleichen Teilen vorlagen (Abb. IV.32). Bei AdsFlt-1 MOI 20 /AdVEGF MOI 10 hatte sich die messbare VEGF-Konzentration mehr als halbiert ($29,69 \pm 0,16 \text{ ng/mL}$), war jedoch trotz AdsFlt-1-Überschuß noch messbar. In den höheren Konzentrationsstufen war VEGF nicht mehr nachweisbar. Ein ähnliches Muster zeigt die Co-Expression mit AdVEGF MOI 20. Obgleich die Konzentrationen hier gering höher ausfallen, mit AdsFlt-1 MOI 10: $83,17 \pm 1,7 \text{ ng/mL}$, MOI 20: $50,71 \pm 6,5 \text{ ng/mL}$ und MOI 40: $5,28 \pm 5,9 \text{ ng/mL}$, ist VEGF ebenso ab AdsFlt-1 MOI 50 nicht mehr nachweisbar.

Bei der VEGF-Messung ausgewählter Zelllysate der Konzentrationsstufe MOI 50 und MOI 100 konnte kein VEGF nachgewiesen werden. Das demonstriert die vollständige Sekretion von VEGF, und bestätigt die Beobachtung der VEGF-Konzentration in den Zellüberständen

(Abb. IV.32). Diese Resultate zeigen, dass mit ansteigender AdsFlt-1 MOI ein Überschuß an sFlt-1 vorherrscht, der das co-exprimierte VEGF komplett bindet (vgl. Abb. IV.30, IV.31, IV.32 und IV.33.). Dennoch scheint bei gleicher MOI die Menge an exprimiertem VEGF höher auszufallen als die des exprimierten sFlt-1.

AdVEGF-Konzentrationsreihe (MOI 10, 20, 40, 50, 100, 150)

Um den reversen Effekt zu betrachten wurden Zellen ebenfalls mit AdVEGF Konzentrationsreihen (MOI 10, 20, 40, 50, 100, 150) infiziert, und zwei der drei Reihen jeweils mit AdsFlt-1 MOI 10 und AdsFlt-1 MOI 20 co-infiziert.

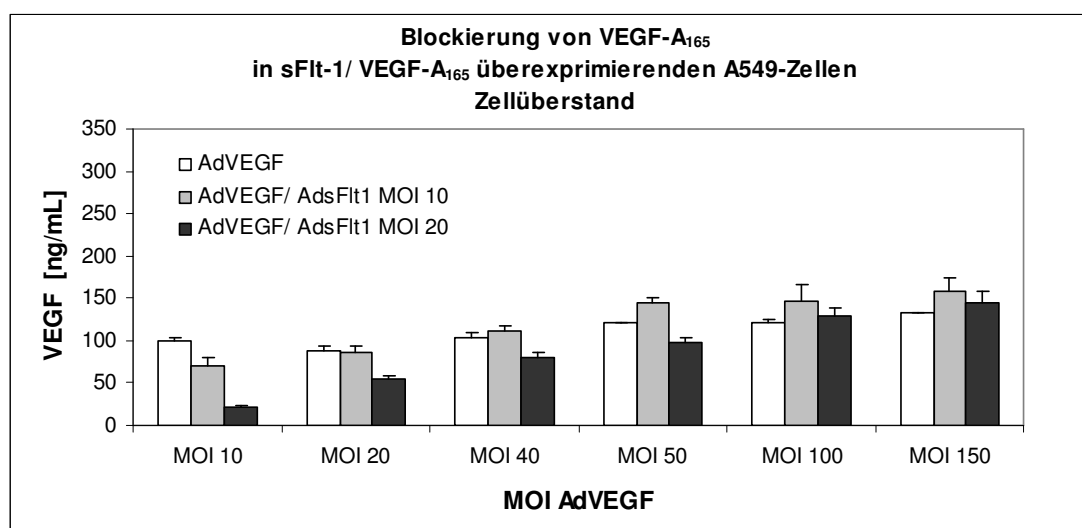


Abb. IV.33: VEGF- Konzentration im Überstand adenoviral infizierter Zellen mit ansteigender Verdünnungsreihe an AdVEGF. Die Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen an AdVEGF infiziert. Dabei wurden die Zellen als erstes mit AdVEGF separat infiziert (weiße Balken), als zweites mit AdsFlt-1 MOI 10 co-infiziert (hellgrauer Balken), und als drittes mit AdsFlt-1 MOI 20 co-infiziert (schwarzer Balken). Die dargestellten Werte sind repräsentativ für Mittelwerte aus zwei Experimenten.

Die Monoinfektion mit AdVEGF (MOI 10, 20, 40, 50, 100, 150) resultierte in Proteinkonzentrationen im Zellüberstand von $100,6 \pm 3,4 \text{ ng/mL}$ bis $133,0 \pm 0,1 \text{ ng/mL}$ bei MOI 150, und demonstrierte nicht den bei der AdsFlt-1-Einzelfektion beobachteten starken Anstieg (Abb. IV.33). Bei dieser Konzentrationsreihe zeigen die Proben von MOI 50 und MOI 100 keinen Unterschied mehr ($121,3 \pm 0,21 \text{ ng/mL}$ vs $121,3 \pm 3,5 \text{ ng/mL}$) und deuten die Sättigung für die Expression dieses Proteins an. Mit $132,9 \pm 0,1 \text{ ng/mL}$ liegt der Wert von MOI 150 nur geringfügig über dem der beiden vorangegangenen Konzentrationsstufen, und kann in die Sättigung mit einbezogen werden. Vergleicht man die Menge an exprimiertem Protein aus der AdsFlt-1-Einzelfektion (Abb. IV.30) mit der der AdVEGF-Einzelfektion (Abb. IV.33), so liegt die Proteinmenge für Flt-1 laut diesem Experiment mindestens um den Faktor 15 höher als die Proteinmenge für VEGF. Dieser Konzentrationsunterschied sollte sich auf das Verhältnis der Adenoviren in der Co-expression auswirken. Diese Beobachtung gibt

einen wichtigen Hinweis auf die später im Tiermodell anzuwendende Dosis rekombinanter Adenoviren.

Die Co-Expression mit AdsFlt-1 MOI 10 in der AdVEGF Konzentrationsreihe (MOI 10, 20, 40, 50, 100, 150) zeigte nur eine deutliche Verminderung der VEGF-Konzentration bei der ersten Konzentrationstufe AdVEGF MOI 10 von $100,6 \pm 3,4 \text{ ng/mL}$ auf $70,9 \pm 9,7 \text{ ng/mL}$, im Vergleich zur Einzelinfektion. Da die Konzentrationen der Einzelinfektion in weiteren MOIs von AdVEGF geringer als in den blockierten Proben ausfielen, wurden später die Zellysate ausgewählter Konzentrationen untersucht, um zu sehen ob sich diese Beobachtung auch in der Zelle bestätigt (Abb. IV.34). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl bei AdVEGF MOI 10 als auch bei MOI 100 die Konzentration der VEGF-Einzelinfektion über der der Co-expression lag, die Beobachtung sich also nicht bestätigte. So wurde bei AdVEGF MOI 10 ein Wert von $10,25 \pm 2,3 \text{ ng Flt-1/mg Gesamtprotein}$ nachgewiesen, während die Co-Expression mit AdsFlt-1 MOI 10 $8,2 \pm 0,6 \text{ ng Flt-1 /mg Gesamtprotein}$, und mit AdsFlt-1 MOI 20 nur $8 \pm 0,1 \text{ ng Flt-1/mg Gesamtprotein}$ aufwies. Die Verhältnisse bei AdVEGF MOI 100 lagen ähnlich. Die Probe der Einzelinfektion wies einen Wert von $17,75 \pm 1,91 \text{ ng Flt-1 /mg Gesamtprotein}$ auf. Die Co-Expression mit AdsFlt-1 MOI 10 hingegen zeigte $15,7 \pm 1,7 \text{ ng Flt-1/mg Gesamtprotein}$, und die mit AdsFlt-1 MOI 20 eine geringfügig niedrigere Konzentration von $14,85 \pm 3,5 \text{ ng Flt-1/mg Gesamtprotein}$. Der im Zellüberstand nachgewiesene Trend der Abnahme der VEGF-Konzentration bei Co-Expression mit AdsFlt-1 ließ sich ebenfalls im Zellysate feststellen.

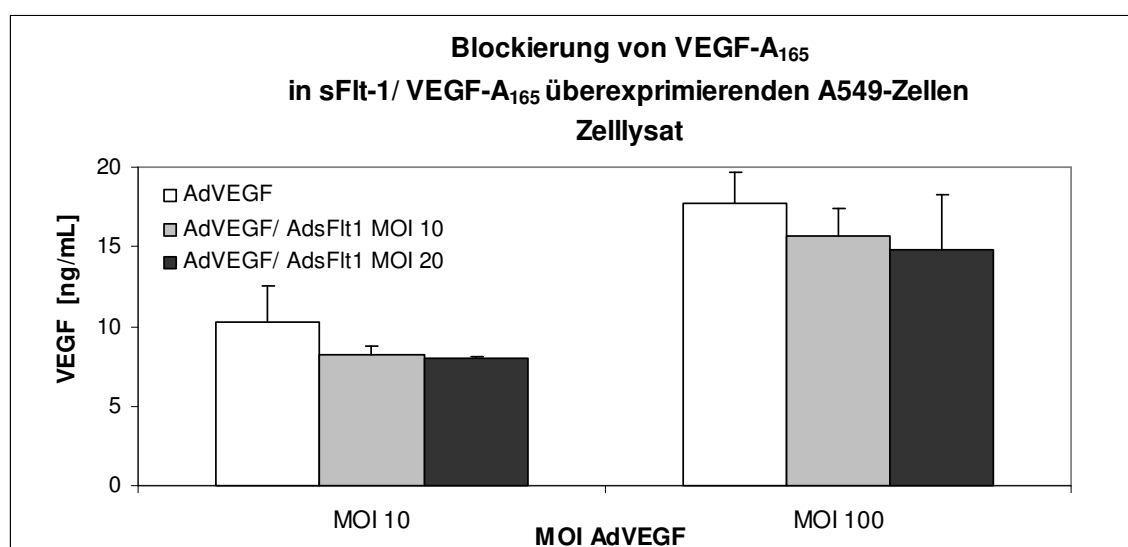


Abb. IV.34: VEGF- Konzentration im Zellysate adenoviral infizierter Zellen mit ansteigender Verdünnungsreihe an AdVEGF. Die Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen an AdVEGF infiziert. Dabei wurden die Zellen als erstes mit AdVEGF separat infiziert (weiße Balken), als zweites mit AdsFlt-1 MOI 10 co-infiziert (hellgrauer Balken), und als drittes mit AdsFlt-1 MOI 20 co-infiziert (schwarzer Balken). In dieser Abbildung sind nur die Zellysate von AdVEGF MOI 10 und MOI 100 gezeigt. Die dargestellten Werte sind repräsentativ für Mittelwerte aus zwei Experimenten.

Die Co-Expression von VEGF mit AdsFlt-1 MOI 20 im Zellüberstand zeigte einen leichten Rückgang der VEGF-Konzentration im Vergleich zu AdsFlt-1 MOI 10 (Abb. IV.33). Die Differenz beider Blockierungen nimmt mit steigender AdsFlt-1 Konzentration ab. Trotz des widersprüchlichen Verlaufs der VEGF-Konzentration in der Einzelinfektion ist zu erkennen, dass mit steigender AdVEGF MOI ebenfalls die Konzentration an gemessenem VEGF zunimmt, sowohl ohne als auch mit Blockierung. Es besteht also eine positive Korrelation zwischen der eingesetzten AdVEGF Konzentration und der Menge an exprimiertem Protein.

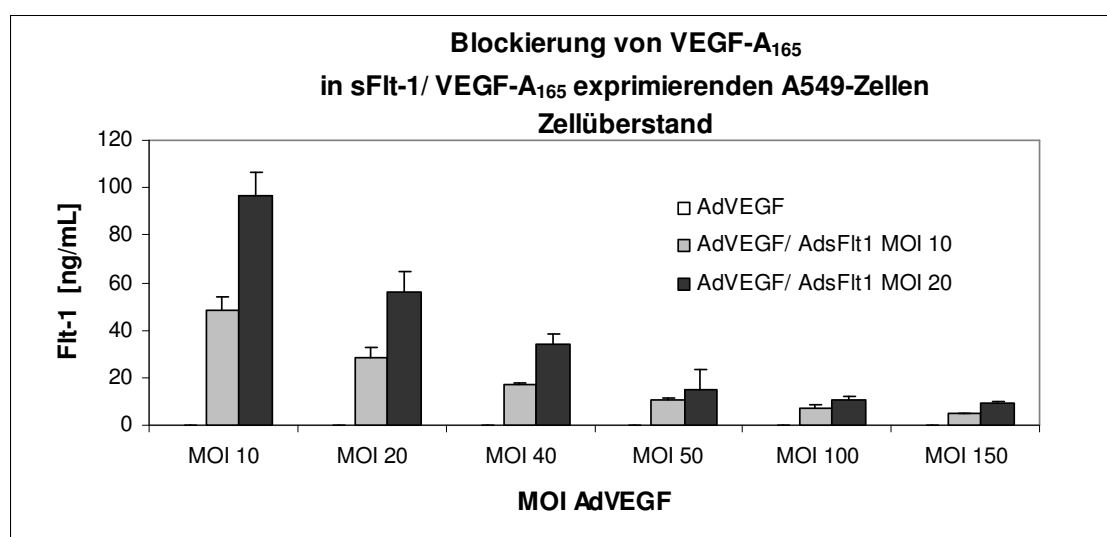


Abb. IV.35: Flt-1- Konzentration im Überstand adenoviral infizierter Zellen mit ansteigender Verdünnungsreihe an AdVEGF. Die Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen an AdVEGF infiziert. Dabei wurden die Zellen als erstes mit AdVEGF separat infiziert (weiße Balken), als zweites mit AdsFlt-1 MOI 10 co-infiziert (hellgrauer Balken), und als drittes mit AdsFlt-1 MOI 20 co-infiziert (schwarzer Balken). Die dargestellten Werte sind repräsentativ für Mittelwerte aus zwei Experimenten.

Bei der Flt-1 Messung der AdVEGF Konzentrationsreihen ließ sich in den monoinfizierten humanen A549-Zellen erwartungsgemäß kein murines sFlt-1 nachweisen (Abb. IV.35). Die Co-Expression der AdVEGF Konzentrationsreihe mit AdsFlt-1 zeigte eine kontinuierliche Abnahme der sFlt-1 Konzentration, das galt sowohl für die Co-Expression mit AdsFlt-1 MOI 10 als auch für die mit AdsFlt-1 MOI 20. Des Weiteren verringerte sich die Differenz zwischen den Blockierungsstufen mit steigender AdVEGF MOI. Verglichen mit dem Anstieg der VEGF-Konzentration bei der VEGF-Messung dieser Proben fällt die Abnahme der sFlt-1 Konzentration deutlich stärker aus bei steigender AdVEGF MOI (vgl. Abb. IV.33 und IV.35). So betrug die Konzentration an sFlt-1 in der AdVEGF MOI 10/ AdsFlt-1 MOI 10 Probe $48,2 \pm 5,9 \text{ ng/mL}$ und fiel dann bei AdVEGF MOI 150/ AdsFlt-1 MOI 10 auf $5,3 \pm 0,9 \text{ ng/mL}$ ab. Die Konzentration an sFlt-1 bei AdVEGF MOI 10/ AdsFlt-1 MOI 20 lag bei $96,3 \pm 1,0 \text{ ng/mL}$ und

verminderte sich dann auf $9,1 \pm 0,6 \text{ ng/mL}$ in der AdVEGF MOI 150/ AdsFlt-1 MOI 20 Probe. In beiden Fällen verminderte sich also die Konzentration des co-exprimierten sFlt-1 auf ein Zehntel der ursprünglich bestimmten Menge, wobei AdVEGF zum Schluß in 15fachem Überschuß bei AdsFlt-1 MOI 10 Co-expression, und in 7,5fachem Überschuß bei AdsFlt-1 MOI 20 Co-Expression zugegeben wurde.

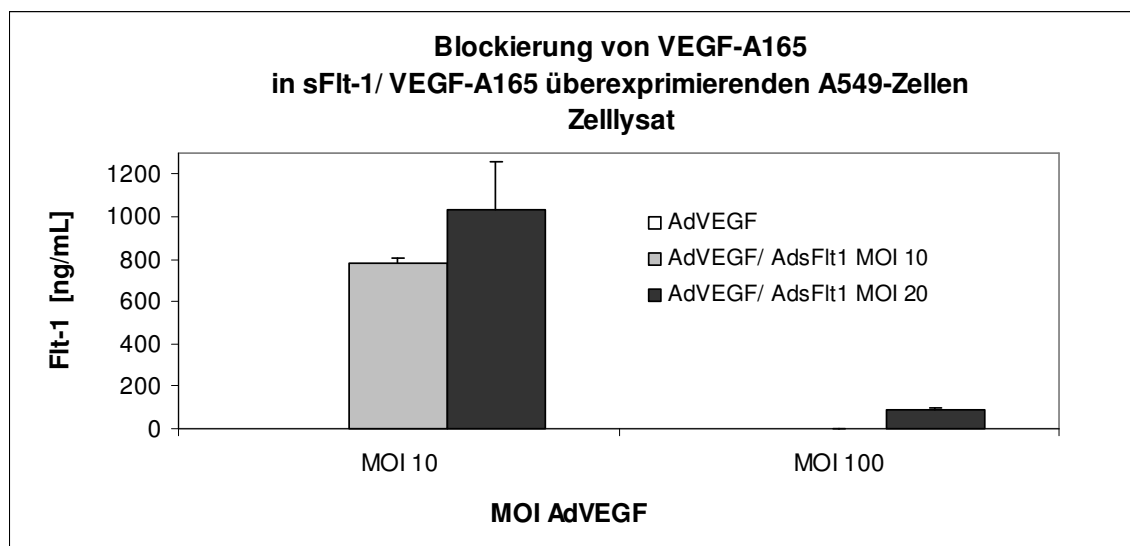


Abb. IV.36: Flt-1- Konzentration im Zelllysate adenoviral infizierter Zellen mit ansteigender Verdünnungsreihe an AdVEGF. Die Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen an AdVEGF infiziert. Dabei wurden die Zellen als erstes mit AdVEGF separat infiziert (weiße Balken), als zweites mit AdsFlt-1 MOI 10 co-infiziert (hellgrauer Balken), und als drittes mit AdsFlt-1 MOI 20 co-infiziert (schwarzer Balken). In dieser Abbildung sind nur die Zelllysate von AdVEGF MOI 10 und MOI 100 gezeigt. Die dargestellten Werte sind repräsentativ für Mittelwerte aus zwei Experimenten.

In ausgewählten Zelllysaten der gleichen Proben konnte für AdVEGF MOI 10 und AdVEGF MOI 100 der im Zellüberstand beobachtete Trend bestätigt werden (Abb. IV.36). So wurde bei Co-Expression mit AdsFlt-1 MOI 10 in der AdVEGF MOI 10 Probe eine Konzentration von $778 \pm 23,3 \text{ ng Flt-1/mg Gesamtprotein}$ detektiert, während in der AdVEGF MOI 100 Probe kein Flt-1 mehr nachgewiesen werden konnte. Die Co-Expression mit AdsFlt-1 MOI 20 hingegen ergab in der AdVEGF MOI 10 Probe einen Wert von $1032 \pm 230,5 \text{ ng Flt-1/mg Gesamtprotein}$, und in der AdVEGF MOI 100 Probe immer noch eine Konzentration von $92,5 \text{ ng Flt-1/mg Gesamtprotein}$.

Zusammenfassend konnte durch diese *in-vitro* Experimente als erstes gezeigt werden, dass humanes VEGF murines sFlt-1 bindet, und somit für die geplanten *in-vivo* Versuche einsetzbar ist.

Des Weiteren wurde eine positive Korrelation zwischen ansteigender MOI der Adenoviren und der Konzentration des exprimierten Proteins beobachtet. Ein Zusammenhang zwischen dem Anstieg der MOI der Verdünnungsreihe und der Abnahme des Proteins der Co-Expression konnte ebenfalls demonstriert werden. Da zudem in der Monoinfektion deutlich höhere Konzentrationen an exprimiertem Protein zu verzeichnen waren als in den co-infizierten Proben, wird die verminderte Proteinkonzentration nach Co-Infektion auf die Bildung von Komplexen zwischen sFlt-1 und VEGF zurückgeführt, die ja mit der zur Verfügung stehenden Messtechnik nicht erfassbar waren.

Die Messung ausgewählter Zellysate bestätigte überwiegend den im Zellüberstand beobachteten Trend von Konzentrationszunahmen oder Konzentrationsabnahmen eines Proteins. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass in der Zelle gebildetes Protein auch sekretiert, und nicht in der Zelle zurückgehalten wurde.

Zudem konnten die von Maynard et al. erwähnten Beobachtungen bestätigt werden, dass die ELISA-Kits der Firma R&D Systems sowohl für murines sFlt-1 als auch für VEGF-A überwiegend das freie ungebundene Protein nachweisen (Maynard et al. 2003).

Nach diesen Erkenntnissen sollten Versuche zur Blockierung der sFlt-1 Aktivität durch adenovirale Co-Expression mit VEGF im Tier erfolgreich durchgeführt werden. Das finale Verhältnis der Adenoviren zueinander muß allerdings erst *in-vivo* ermittelt werden, diese Versuche geben nur einen Hinweis auf die Reaktion der Proteine untereinander. Die Gegenwart anderer Proteine oder anderer Substanzen wird im *in-vitro* Versuch nicht berücksichtigt.

3.2.2 Nachweis exogener Proteine in der Zirkulation und im Gewebe nach sFlt-1/ VEGF-A Co-Expression

Die *in-vitro* Komplexierungsversuche zeigten, dass humanes VEGF murines sFlt-1 bindet. Dabei war die fünfzehnfache Konzentration an AdVEGF erforderlich (Abb. IV.32), um die Menge der durch AdsFlt-1 induzierten exprimierten Proteine überwiegend zu binden. Diese Beobachtung konnte leider so nicht auf die *in-vivo* Situation übertragen werden, da diese entscheidend von zwei anderen Faktoren beeinflusst wurde. Zum Einen zeigten eigene Beobachtungen sowie die Erfahrung anderer Gruppen, dass eine Konzentration von 2×10^8 pfu AdVEGF für Mäuse lethal ist, die Konzentration an AdVEGF also unter der von 2×10^8 pfu liegen muß (Thurston et al. 2000). Dieser Fakt bildete somit die Grundlage für das Verhältnis der VEGF- und sFlt-1-Adenoviren im Mausmodell. Zum Anderen musste die korrespondierende Menge an AdsFlt-1 groß genug sein um einen Effekt hervorzurufen, jedoch gleichzeitig einer Konzentration an Protein entsprechen, die durch co-exprimiertes VEGF komplexiert werden kann. Das heißt, dass nicht die maximale Konzentration an AdsFlt-1 eingesetzt werden konnte. Des Weiteren war die hohe Doppelbelastung des Tieres bei adenoviraler Co-Expression zu berücksichtigen. Das Verhältnis beider Adenoviren mußte also *in-vivo* völlig neu ausgetestet werden, da sich die Voraussetzungen entscheidend geändert hatten.

Aussagekräftige Ergebnisse wurden mit einem Verhältnis von AdsFlt-1: AdVEGF von 35:1 ($3,5 \times 10^9$ vs 1×10^8 pfu) erzielt. Für die Co-Expressionsversuche wurden Tiere ebenfalls separat mit AdVEGF oder AdsFlt-1 infiziert, um die Wirkung der Monoinfektion und –expression zu verdeutlichen, und mit dem Ergebnis der Co-Infektion AdVEGF/ AdsFlt-1 vergleichen zu können.

Um eine erste Information über die erfolgreiche Co-Expression zu erhalten, wurden Flt-1 Konzentrationen im Gewebe und der Zirkulation behandelter Tiere ermittelt und verglichen. Bei Messungen des Liganden VEGF konnte, im Gegensatz zur *in-vitro* Situation, *in-vivo* kein VEGF nachgewiesen werden, weder über einen selbstentwickelten noch durch einen kommerziellen ELISA-Kit.

Flt-1 Konzentration im Lebergewebe

Da die Leber ein gut durchblutetes Organ darstellt und eine hohe Anzahl adenoviraler Rezeptoren (CAR-Rezeptoren) enthält, akkumulieren Adenoviren überwiegend in der Leber. Demzufolge findet hier die Translation und Expression der exogenen Proteine statt.

So konnte für AdVEGF-behandelte Tiere eine Flt-1 Konzentration von $3,7 \pm 0,49$ ng Flt-1/mg Gesamtprotein, und für AdsFlt-1L behandelte Tiere $176,5 \pm 39,7$ ng Flt-1/mg Gesamtprotein nachgewiesen werden. Die durchschnittliche Konzentration in AdsFlt-1L/ AdVEGF behandelten Tieren lag bei $7,9 \pm 2,6$ ng Flt-1/mg Gesamtprotein, und repräsentierte damit eine statistisch signifikante Verminderung der Flt-1 Menge im Vergleich zur Einzelinfektion um 95,5% durch VEGF Co-Expression (Abb. IV.37).

Dieses Ergebnis gibt einen Hinweis darauf, dass die Bindung des freien sFlt-1 durch VEGF bereits in der Leber stattfindet.

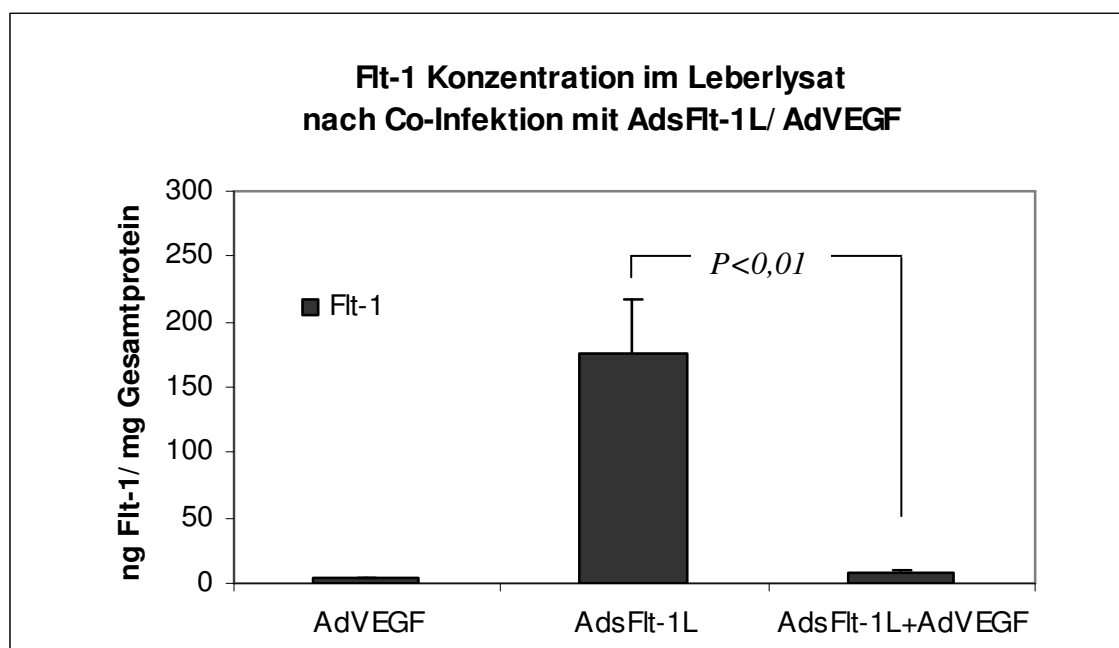


Abb. IV.37: Flt-1 Konzentration im Leberlysate nach Co-Infektion mit AdsFlt-1L/ AdVEGF

Konzentration im AdVEGF- behandelten Tier (n=3); Konzentration im AdsFlt-1L- behandelten Tier (n=3); Konzentration im AdsFlt-1L/ AdVEGF- behandelten Tier (n=4)

Flt-1 Konzentration im Plasma

In der Zirkulation fielen die Messungen erwartungsgemäß niedriger aus. Die AdsFlt-1-behandelten Tiere zeigten einen Mittelwert von $74,7 \pm 32,8 \text{ ng/mL}$ Flt-1, während bei AdVEGF behandelten Tieren dieses Protein nicht nachgewiesen werden konnte. Die Co-Expression beider Proteine ergab eine Flt-1 Konzentration von $10,6 \pm 3,4 \text{ ng/mL}$, die eine Abnahme des frei messbaren sFlt-1 von 85,8% gegenüber der Monoinfektion darstellt, und damit einen statistisch wahrscheinlichen Unterschied zur Gruppe der AdsFlt-1L behandelten Tiere repräsentiert (Abb. IV.38).

Diese Messung bestätigte die in der Leber ermittelten Werte. Während in der Leber noch endogene Konzentrationen an Flt-1 im AdVEGF-infizierten Tier nachweisbar waren, so konnte im Plasma kein freies Flt-1 mehr detektiert werden. Das zeigt, dass im Plasma vorhandenes sFlt-1 möglicherweise durch VEGF gebunden wurde.

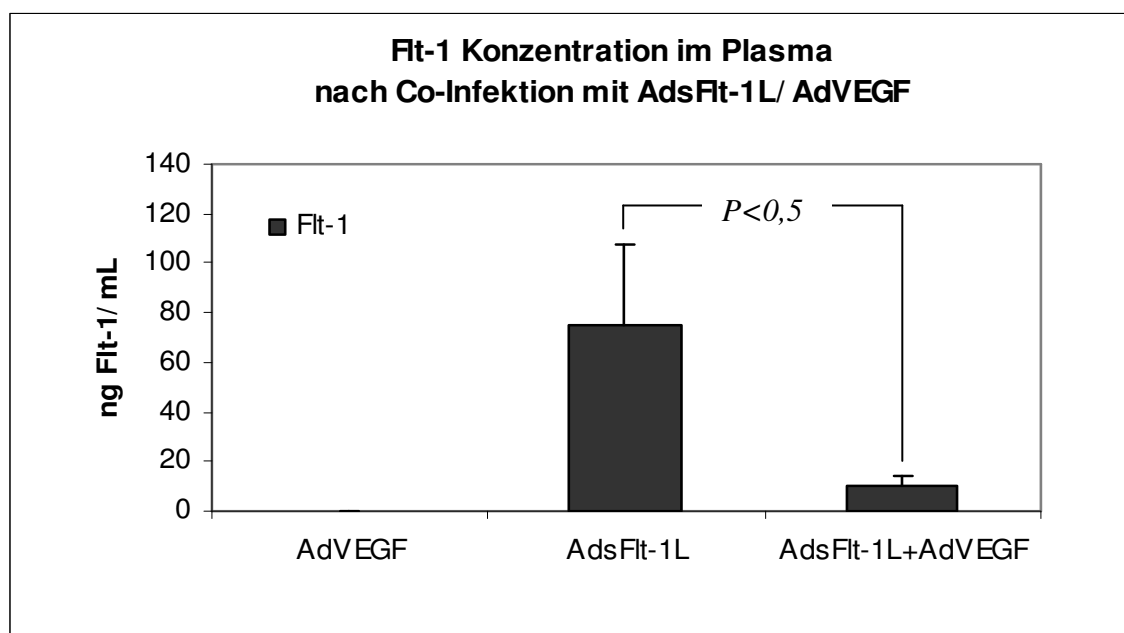


Abb. IV.38: Flt-1 Konzentration im Plasma nach Co-Infektion mit AdsFlt-1L/ AdVEGF

Konzentration im AdVEGF- behandelten Tier (n=3); Konzentration im AdsFlt-1L- behandelten Tier (n=3); Konzentration im AdsFlt-1L/ AdVEGF- behandelten Tier (n=4)

Flt-1 Konzentration im Nierengewebe

In der stark VEGF-regulierten, renalen Region stellte sich die Lage anders dar. So konnte in AdVEGF-behandelten Tieren $26,1 \pm 16,3$ ng Flt-1/mg Gesamtprotein, und in AdsFlt-1L-behandelten Tieren $59,1 \pm 14,6$ ng Flt-1/mg Gesamtprotein nachgewiesen werden. Die Messung der Co-Infektion zeigte mit $60,6 \pm 31,5$ ng Flt-1/mg Gesamtprotein keine Veränderung gegenüber den Flt-1 behandelten Tieren (Abb. IV.39).

Dieses Resultat gibt Anlass zu der Vermutung, dass in der Niere eine höhere Konzentration an endogenem Flt-1 vorliegt, da auch im AdVEGF-infizierten Tier die Konzentration an diesem Protein noch gut nachweisbar ist. So kann im co-exprimierten Tier endogenes Flt-1 nicht mehr durch exogenes VEGF kompensiert werden, da dieses schon durch die teilweise Bindung von exogenem Flt-1 verbraucht ist. Die Konzentration an freiem Flt-1 verhält sich in der AdsFlt-1L –Probe demzufolge ähnlich wie in der AdsFlt-1L/ AdVEGF-Probe.

Da diese Messergebnisse jedoch aus lediglich zwei Proben generiert wurden, die teilweise stark differierten, kann diese tendenziell unerwartete Beobachtung auch auf die geringe Probenanzahl zurückgeführt werden.

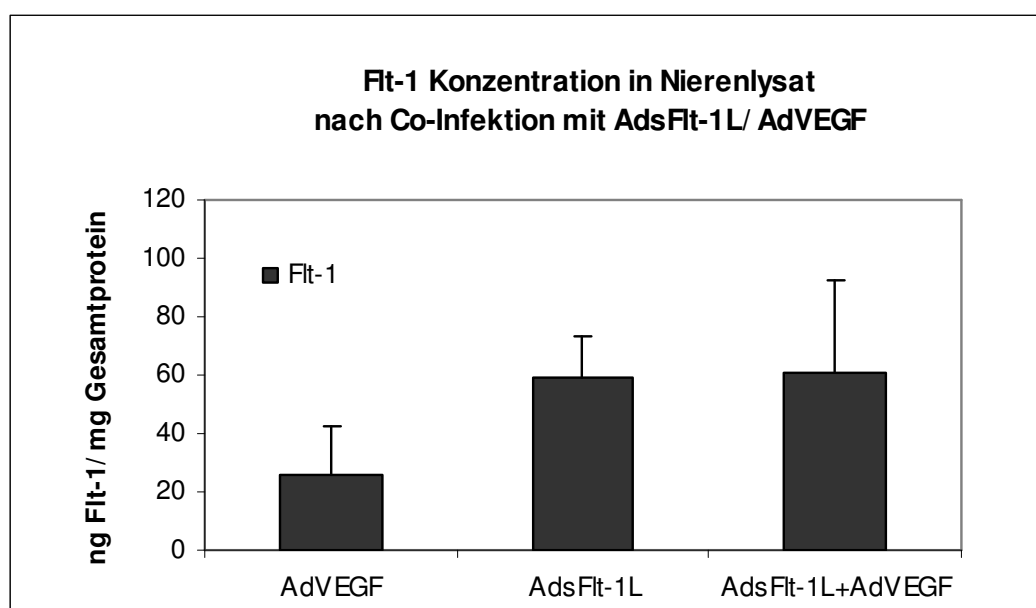


Abb. IV.39: Flt-1 Konzentration in Nierenlysat nach Co-Infektion mit AdsFlt-1L/ AdVEGF

Konzentration im AdVEGF- behandelten Tier (n=2); Konzentration im AdsFlt-1L- behandelten Tier (n=2); Konzentration im AdsFlt-1L/ AdVEGF- behandelten Tier (n=2)

Flt-1 Konzentration im Urin

Der in der Niere beobachtete Trend konnte durch Flt-1 Messungen im Urin nicht bestätigt werden. Hier betrug die Menge an Flt-1 in AdsFlt-1L behandelten Tieren $9,0 \pm 1,7 \text{ ng/mL}$. Im Urin AdVEGF behandelter Tiere wurde kein Flt-1 nachgewiesen. Die Konzentration im Harn co-infizierter Tiere betrug $1,3 \pm 1,8 \text{ ng/mL}$, und repräsentiert damit wieder eine statistisch signifikante Abnahme um 85,6% gegenüber monoinfizierten Tieren (Abb.IV.40).

Dieses Ergebnis deutet darauf, dass bei Co-Expression ein Großteil des exogenen sFlt-1 möglicherweise durch VEGF gebunden wurde, und bestätigt die Beobachtungen in Leber und Plasma. Da in AdVEGF behandelten Tieren kein Flt-1 nachgewiesen werden konnte, handelt es sich bei dem in co-exprimierten Tieren gemessenen Flt-1 nur um exogenes Protein.

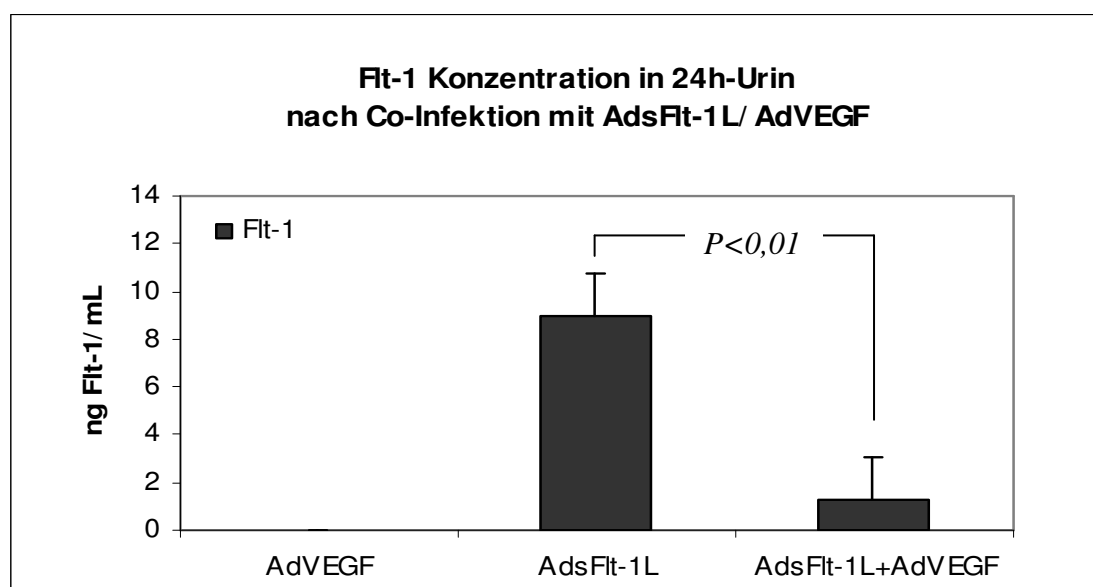


Abb. IV.40: Flt-1 Konzentration im Urin nach Co-Infektion mit AdsFlt-1L/ AdVEGF

Konzentration im AdVEGF- behandelten Tier (n=3); Konzentration im AdsFlt-1L- behandelten Tier (n=3); Konzentration im AdsFlt-1L/ AdVEGF-behandelten Tier (n=2)

Die Versuche demonstrierten, dass humanes VEGF *in-vivo* ebenfalls murines Flt-1 bindet. Dabei konnte die Menge an frei detektierbarem Flt-1 um bis zu 95% durch Co-Expression von VEGF in der Leber vermindert werden. Dieser Trend setzte sich in der Zirkulation mit 85,8% fort, konnte jedoch in der Niere nicht bestätigt werden. Im Urin wurde dann wieder eine Reduktion der Flt-1 Konzentration beobachtet, die sich mit 85,6% ähnlich wie in der Zirkulation verhielt. Dieses Resultat lässt vermuten, dass exogenes sFlt-1 bei Co-Expression mit VEGF bereits in der Leber gebunden wird.

3.2.3 Morphologische Veränderungen von Leber und Milz nach sFlt-1/ VEGF-A Co-Expression

Die morphologische Veränderung von Leber und Milz konnte ebenfalls bei den Blockierungsversuchen beobachtet werden. So wurde bei AdVEGF behandelten Tieren eine Lebermasse von $1,06 \pm 0,14\text{g}$, und bei AdsFlt-1L behandelten Tieren ein Gewicht von $1,75 \pm 0,38\text{g}$ festgestellt. Das Lebergewicht der Tiere mit Co-Expression lag bei $1,46 \pm 0,15\text{g}$, und war damit um 16,6% geringer im Vergleich zur Gruppe der AdsFlt-1L Behandlung (Abb. IV.41). Damit spiegelte sich im Gewicht dieses Organs der beobachtete Trend bei der Bestimmung des freien Flt-1 in der Leber wieder.

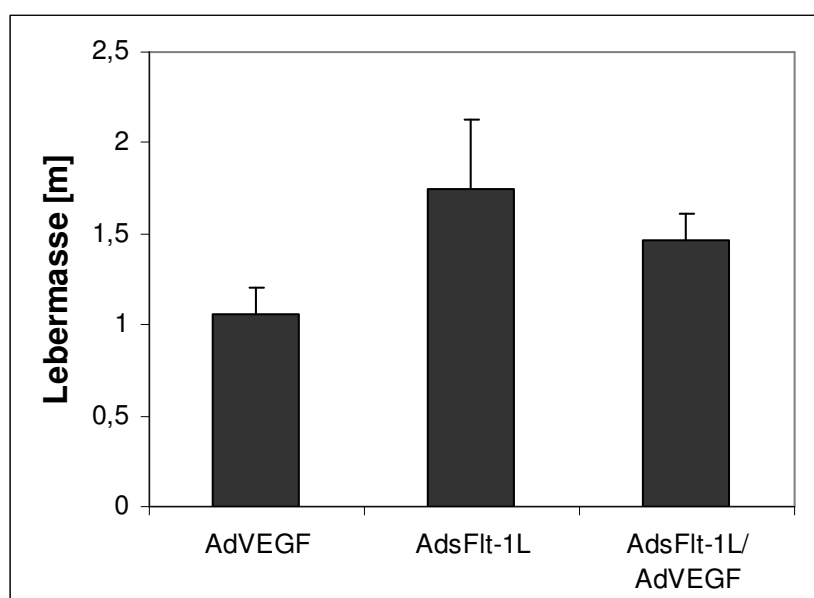


Abb. IV.41: Makroskopische Veränderungen der Leber nach adenoviraler Behandlung

Es sind die durchschnittlichen Lebermassen AdVEGF-behandelter Tiere (n=18); AdsFlt-1L- behandelte Tiere (n=15) und AdsFlt-1L/ AdVEGF behandelte Tiere (n=6) dargestellt.

In der Milz setzte sich diese Beobachtung fort. Die Milzen AdVEGF infizierter Tiere zeigten eine durchschnittliche Länge von $1,93 \pm 0,06\text{cm}$. Die Gruppe der AdsFlt-1L behandelten Tiere hingegen wies Milzlängen von $2,37 \pm 0,21\text{cm}$ auf. Bei der adenoviralen Co-Expression von sFlt-1L und VEGF ging die Milzlänge zurück auf $2,28 \pm 0,19\text{cm}$, und offenbarte damit nur einen leichten Rückgang von 3,8% im Vergleich zur AdsFlt-1L Behandlung (Abb. IV.42).

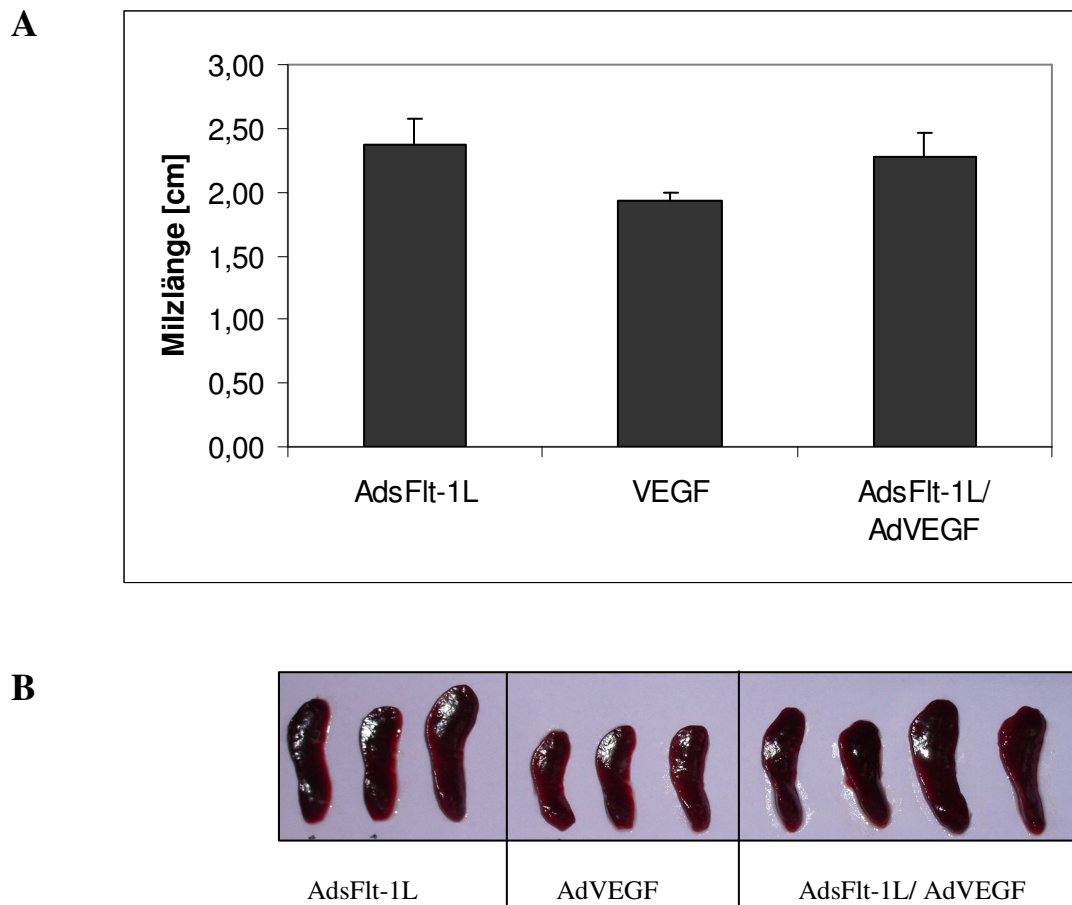


Abb. IV.42: Makroskopische Veränderungen der Milz nach adenoviraler Behandlung

Dargestellt sind Ergebnisse eines zusammenhängenden Experiments. **A)** Es sind die Milzlängen AdsFlt-1L behandelter Tiere (n=3); AdVEGF-behandelter Tiere (n=3) und AdsFlt-1L/ AdVEGF behandelter Tiere (n=4) dargestellt. Die Daten sind Mittelwerte und repräsentativ für die mit n angegebenen Tiere. **B)** Fotografien der in A) evaluierten Organe.

3.2.4 Histologische Veränderungen der Niere nach sFlt-1/ VEGF-A Co-Expression

Es konnte bereits gezeigt werden, dass überexprimiertes murines sFlt-1 durch Co-Expression des Liganden VEGF-A₁₆₅ gebunden und somit inaktiviert wird. Als Folge davon sollten die durch separate Überexpression des murinen sFlt-1 erzielten Schädigungen der Niere abnehmen oder nicht mehr auftreten.

Histopathologie der Niere

Die histologische Begutachtung der Niere zeigte pathomorphologische Veränderungen im Bereich der juxtamedullär gelegenen Glomeruli von AdsFlt-1L behandelten Tieren (Abb.IV.43). Die Glomeruli stellten sich verdichtet und die glomerulären Kapillaren partiell okkludiert dar. Im Gegensatz dazu wiesen die glomerulären Strukturen VEGF-behandelter Tiere hingegen keine starken Schäden auf. Die Glomeruli zeigten sich kaum verdichtet und eine Vielzahl freier Lumen in Form von weißen Bereichen präsentierte sich in HE- und PAS-gefärbten Schnitten. Präparate co-behandelter Tiere wiesen eine leichte Okklusion der Kapillaren auf.

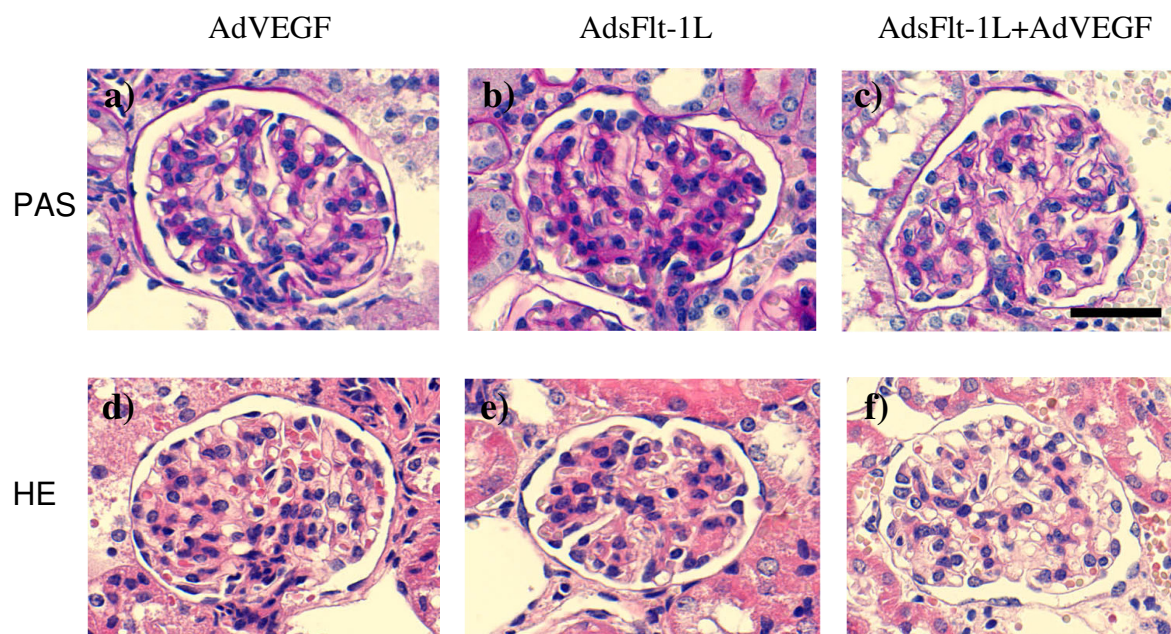


Abb. IV.43: Histologie der Niere nach sFlt-1/ VEGFA Co-Expression

Nierenschnitte von AdVEGF-behandelten Tieren (a,d), von AdsFlt-1L behandelten Tieren (b,e), und von AdsFlt-1L/AdVEGF behandelten Tieren (c,f) zeigen jeweils ein repräsentatives Glomerulum. Im Vergleich zu den Glomeruli der AdVEGF-behandelten (a,d) und AdsFlt-1L/AdVEGF-behandelten Tiere (c,f) stellen sich die Glomeruli der AdsFlt-1L-behandelten Tiere (b,e) stark verdichtet dar, mit partiell okkludierten Kapillarschlingen. AdsFlt-1L/AdVEGF-behandelte Tiere (c,f) zeigen eine leichte Okklusion der Kapillaren. PAS- Periodisch-Saure-Schiffs-Reaktion, HE- Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Der Größenbalken steht für 50µm.

Allein der Schnitt des sFlt-1L behandelten Tieres offenbarte in der PAS-Reaktion eine leichte Akkumulation von Mucopolysacchariden, die in dieser Form weder im Schnitt des VEGF-behandelten, noch im Schnitt des AdsFlt-1L/ AdVEGF co-infizierten Tieres beobachtet werden konnte, und auf eine erhöhte Konzentration der extrazellulären Matrix deuten kann.

Bei der Evaluierung der morphologischen Veränderung der Glomeruli konnte für gesichtete Präparate von AdVEGF behandelten Tieren ein Grad von $2,9 \pm 1,8$ und für AdsFlt-1L behandelte Tiere ein Wert von $4,8 \pm 2,6$ festgestellt werden. Die Betrachtung der Präparate AdsFlt-1L/AdVEGF behandelter Tiere hingegen ergab einen Grad von $1,8 \pm 1,3$ (Abb. IV.44).

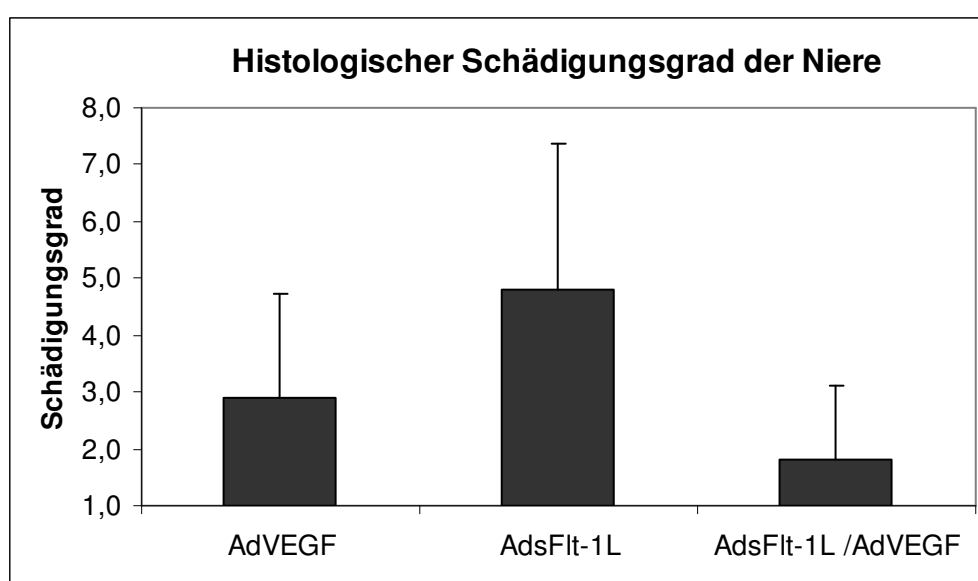


Abb. IV.44: Histologischer Schädigungsgrad der Niere nach sFlt-1/ VEGF-A Co-Expression

Dargestellt ist die durchschnittliche Schädigung von AdVEGF-behandelten Tieren (n=5), von AdsFlt-1L-behandelten Tieren (n=5) und von AdsFlt-1L/AdVEGF-behandelten Tieren (n=5). Grad 1 = keine Schädigung, Grad 9,5 = massive Schädigung der glomerulären Histologie. Erläuterungen im Text.

Die Resultate dieser Schnitte deuten an, dass in Co-Expression mit VEGF exprimiertes sFlt-1 einen abweichenden Effekt hinsichtlich der im Paraffinschnitt sichtbaren morphologischen Veränderungen bewirkte, im Vergleich zur Einzelexpression. Der glomeruläre Schaden im Schnitt des co-exprimierten Tieres war deutlich schwächer verglichen mit dem der AdsFlt-1 Monoinfektion.

3.2.5 Veränderung der Albuminkonzentration im Harn nach sFlt-1/ VEGF-A Co-Expression

Nachdem bei sFlt-1 Überexpression eine schwere Proteinurie nachgewiesen werden konnte (vgl. Kap. IV.3.1.5), sollte nun geprüft werden, inwieweit Proteinmessungen im Harn die histologischen Ergebnisse der Co-Expression bestätigen. Dafür wurde erneut Urin behandelter Tiere nach Ablauf des Experimentes über einen Zeitraum von 24h gesammelt.

Nachweis von Gesamtprotein im Harn

Wie bereits beschrieben galt für die Bestimmung des Gesamtproteins die Silberfärbung als Methode der Wahl, da dieses Verfahren keine Interferenzen mit dem Probenmaterial aufwies. So wurden je 1µL unverdünnten Harns aus der 24h-Urinprobe auf ein 10%-SDS-Polyacrylamid-Gel geladen, nach erfolgter Auftrennung die Proteine fixiert und durch Silberniederschlag gefärbt.

Im Vergleich wiesen alle drei Proben eine Bande dominierender Intensität bei 67kDa auf (Abb. IV.45). Dabei war die Signalstärke der Harnprobe des co-infizierten Tieres weitaus geringer als die des AdsFlt-1L infizierten Tieres, und vergleichbar mit der des AdVEGF behandelten Tieres. Die intensive Braunfärbung repräsentierte eine hohe Proteinkonzentration bei 67kDa im Urin des AdsFlt-1L behandelten Tieres.

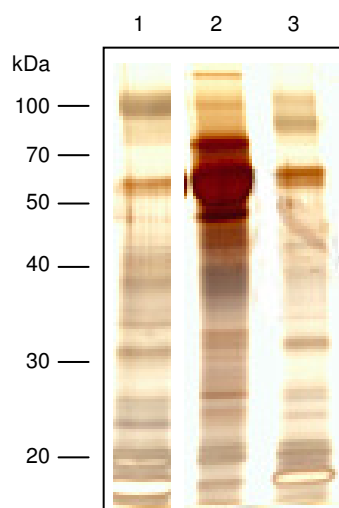


Abb. IV.45: Nachweis von Gesamtprotein im Harn nach Co-Infektion mit AdsFlt-1L/ AdVEGF

Je 1µL unverdünnter Harn wurde aufgetragen. Spur1: AdVEGF-behandeltes Tier, Spur2: AdsFlt-1L-behandeltes Tier, Spur3: AdsFlt-1L/ AdVEGF behandeltes Tier. Silberfärbung.

Diese Beobachtungen konnten durch weitere Experimente belegt werden (Abb. IV.46).

Das Ergebnis zeigt, dass die Co-Expression von sFlt-1 und VEGF im Tier zu einem stark verminderten Proteingehalt im Urin führt, verglichen mit der singulären Überexpression.

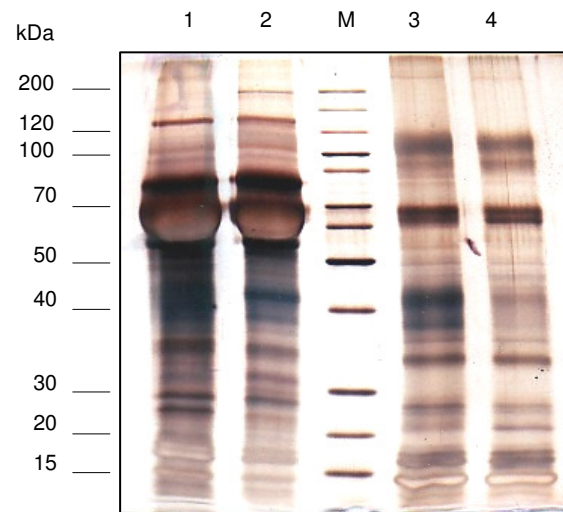


Abb. IV.46: Nachweis von Gesamtprotein im Harn nach Co-Infektion mit AdsFlt-1L/ AdVEGF (weitere Proben). Je 1 μ L unverdünnter Harn wurde aufgetragen. Spur 1 und 2: AdsFlt-1L-behandelte Tiere, Spur 3 und 4: AdsFlt-1L/ AdVEGF behandelte Tiere. M – Markerproteinleiter. Silberfärbung.

Nachweis von Albumin im Harn

Der gezielte Nachweis des Blutplasma Proteins Albumin im Urin der behandelten Tiere bestätigte die Vermutung, dass es sich bei der die Silberfärbung dominierenden Bande um Albumin handelt (Abb. IV.47). So wurden im Urin der co-exprimierten Probe $0,134 \pm 0,1 \text{ mg/mL}$ Albumin gemessen, die im starken Gegensatz zu den $15,6 \pm 3,1 \text{ mg/mL}$ Albumin der sFlt-1L behandelten Probe standen. Die Messung der AdVEGF Harnprobe wies ebenfalls eine nur geringe Konzentration von $0,216 \pm 0,1 \text{ mg/mL}$ Albumin auf. Allerdings stellt diese Konzentration, wie die Probe der Co-Expression auch, die doppelte Menge der bei Kontrollvirus bestimmten Proteinkonzentration von $0,071 \pm 0,03 \text{ mg/mL}$ dar.

Durch Co-Expression des Liganden VEGF, neben sFlt-1, konnte also keine Albuminerhöhung im Harn behandelter Tiere festgestellt werden.

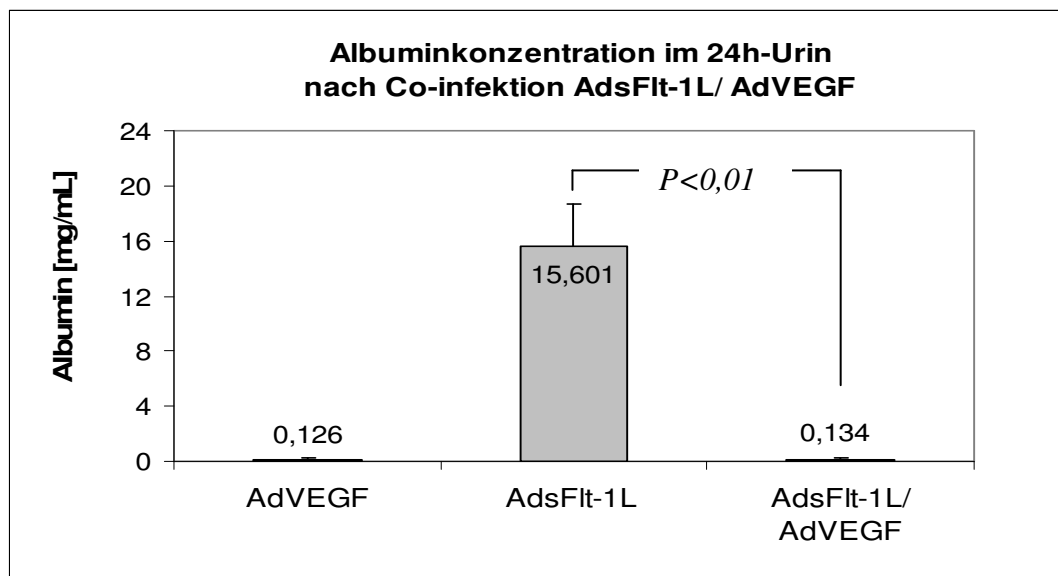


Abb. IV.47: Quantitativer Nachweis von Albumin im Harn nach Co-Infektion mit AdsFlt-1L/ AdVEGF
Über ELISA-Messungen wurde im Harn AdVEGF behandelter Tiere (n=3) , AdsFlt-1L-behandelter Tiere (n=3), und AdsFlt-1L/ AdVEGF behandelter Tiere (n=2) murines Albumin quantitativ nachgewiesen.

Ratio Albumin/ Creatinin im Harn

Creatinin wird, wie bereits erwähnt, durch die Niere vollständig aus dem Plasma entfernt. Aus diesem Grund wird die gemessene Albuminmenge auf Creatinin im Urin bezogen, um so einen einheitlichen Vergleich zwischen den Proben zu erhalten. So wurde in unbehandelten Proben eine Ratio von urinärem Albumin/ Creatinin von $0,133 \pm 0,04 \text{ mg/mg}$ bestimmt. In sFlt-1L behandelten Tieren betrug sie $49,2 \pm 3,28 \text{ mg/mg}$ und fiel in co-exprimierten Proben auf $0,271 \pm 0,04 \text{ mg/mg}$ zurück (Abb. IV.48). Damit bestätigte sich das Muster der quantitativen Proteinbestimmung.

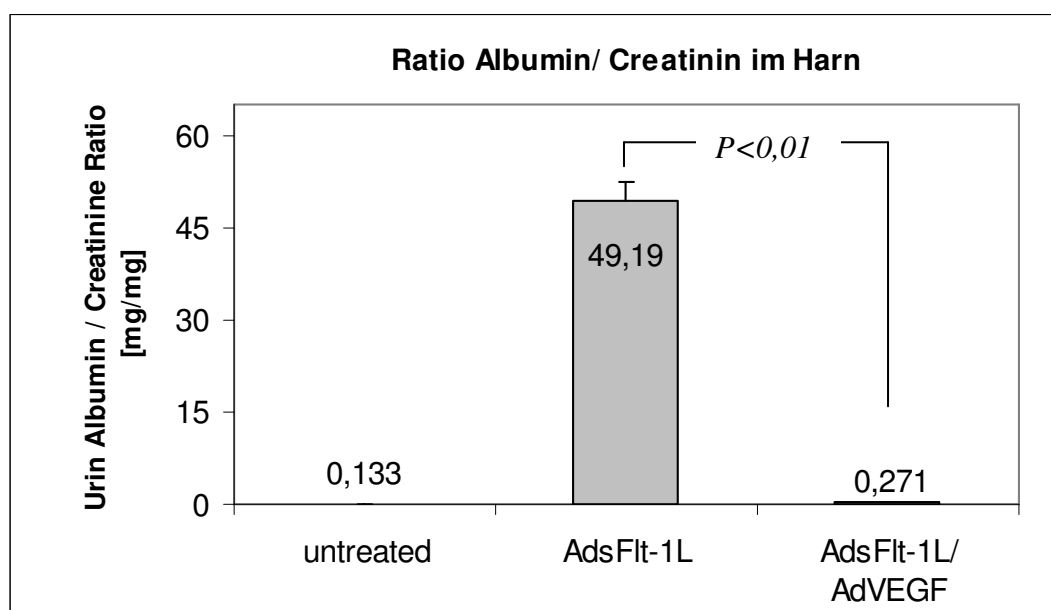


Abb. IV.48: Ratio Albumin/ Creatinin im Harn nach Co-Infektion mit AdsFlt-1L/ AdVEGF

Dargestellt sind die Mittelwerte von unbehandelten (n=1), AdsFlt-1L behandelten (n=2), und AdsFlt-1L/ AdVEGF behandelten Tiere (n=2), M – Markerproteinleiter

Creatinin-Clearance

Zur weiteren Beurteilung der Nierenfunktion und der glomerulären Filtrationsbarriere wurde die Creatinin-Clearance bestimmt, das Verhältnis der Creatininkonzentration im Harn (bezogen auf das Harnvolumen) zur Creatininkonzentration im Plasma (Abb. IV.49). Da Creatinin in der Niere nicht rückresorbiert sondern vollständig filtriert wird, kann von diesem Verhältnis auf die glomeruläre Filtrationsrate geschlossen werden. Diese gibt dann darüber Aufschluß, ob eine Beeinträchtigung der glomerulären Filtration vorliegt, die gegebenenfalls auf die Schädigung der Filtrationsbarriere zurückgeführt werden kann. Die Creatinin-Clearance für die co-exprimierte Probe lag mit $3,52 \pm 0,43 \text{ L/24h}$ nur geringfügig unter der der singulären sFlt-1L-Expression mit $4,51 \pm 1,26 \text{ L/24h}$. Die Werte wiesen damit etwa das 2,4fache bzw das 3fache der im unbehandelten Tier ermittelten Menge auf, lagen jedoch deutlich unter dem Volumen der sFlt-1H-Überexpression von $13,89 \pm 5,31 \text{ L/24h}$.

Der glomeruläre Filtrationsfluß ist also der Negativkontrolle gegenüber erhöht, und hat sich durch Co-Expression von sFlt-1L und VEGF nicht signifikant vermindert. Da eine erhöhte Creatinin-Clearance auf eine verstärkte Permeabilität der Schlitzmembran deutet ist es möglich, dass sowohl in AdsFlt-1L als auch in AdsFlt-1L/AdVEGF behandelten Tieren der glomeruläre Filtrationsfluß erhöht ist. Damit kann eine leichte Schädigung der Filtrationsbarriere vorliegen, die jedoch in AdsFlt-1L/AdVEGF behandelten Tieren unkritisch gegenüber großen Plasmaproteinen wie Albumin scheint.

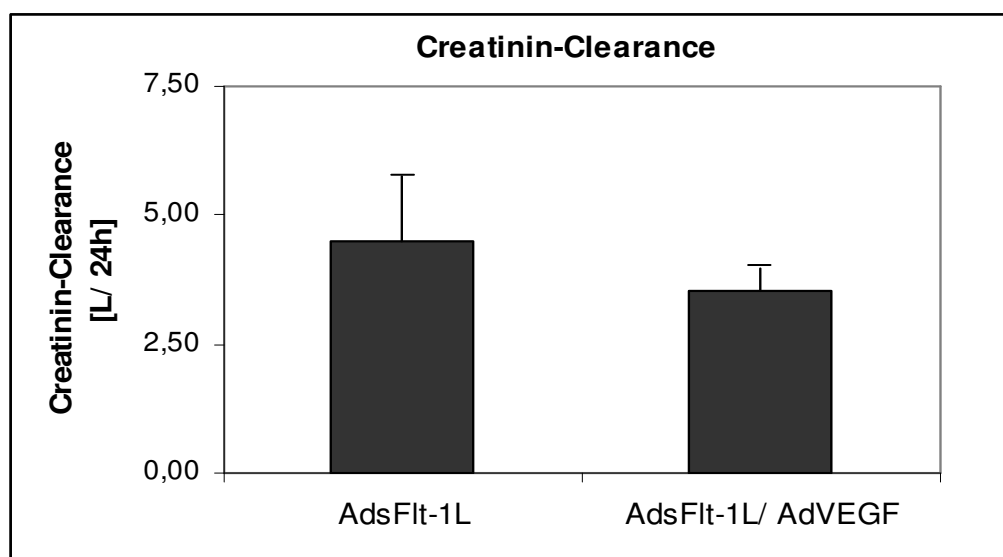


Abb. IV.49: Creatinin-Clearance nach Co-Infektion mit AdsFlt-1L/ AdVEGF

Dargestellt sind ermittelte Werte von AdsFlt-1L- behandelten Tieren (n=2), und AdsFlt-1L/ AdVEGF behandelten Tieren (n=2).

3.2.6 Einfluß der Co-Expression von sFlt-1/ VEGF-A auf den Blutdruck

Um herauszufinden, ob die Co-Expression von sFlt-1L und VEGF ebenfalls Einfluß auf den Blutdruck nimmt, wurden einzelne Tiere daraufhin beispielhaft untersucht. Auch bei diesen Experimenten mussten die ursprünglich im Blockierungsversuch angewandten Dosen herabgesetzt werden, um die Doppelbelastung der Tiere durch die Implantation des Transmitters und die Belastung durch adenoviralen Befall zu minimieren. Die Dosen der applizierten Adenoviren betrugen in diesem Versuch für AdsFlt-1L 3×10^9 pfu und für AdsFlt-1L (3×10^9 pfu)/ AdVEGF ($0,8 \times 10^8$ pfu) = $3,08 \times 10^9$ pfu. Die Durchführung erfolgte analog zu der Blutdruckmessung bei sFlt-1H Überexpression.

Beim Vergleich des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) wiesen die drei examinieren Tiere keine große Differenz zwischen den Werten vor und nach der adenoviralen Behandlung auf (Abb. IV.50). Jedoch ließ sich ein Trend dahingehend ablesen, dass die Messungen AdsFlt-1L behandelte Tiere einen leichten Anstieg aufwiesen, verglichen mit dem leichten Blutdruckrückgang im co-exprimierten Tier nach Behandlung. So zeigte Tier 1 (AdsFlt-1L_1) einen Anstieg um 7mmHg ($115 \pm 1,53$ vs $108 \pm 1,53$ mmHg) und Tier 2 (AdsFlt-1L_2) eine Zunahme um 10mmHg ($123 \pm 3,61$ vs $113 \pm 0,58$ mmHg). Die Behandlung mit sFlt-1 und VEGF resultierte in einem leichten Rückgang um 5mmHg ($108 \pm 2,65$ vs $113 \pm 1,16$ mmHg). Diese stichprobenartigen Resultate unterstützen die in der Histologie und bei der Bestimmung der Albuminkonzentration im Urin erzielten Beobachtungen.

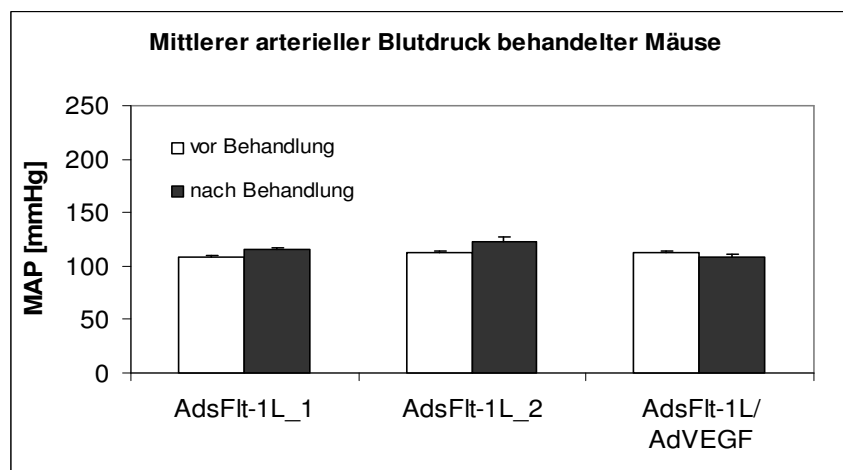


Abb. IV.50: Mittlerer arterieller Blutdruck nach sFlt-1/ VEGF-A Co-Expression

Tiere wurden mit AdsFlt-1L (AdsFlt-1L_1 und AdsFlt-1L_2) und AdsFlt-1L/AdVEGF behandelt. Jeder Doppelbalken ist repräsentativ für ein Tier und drei Messpunkte, und stellt somit Stichproben dar.

Der Verlauf der Blutdruckmessung ist in Abb. IV.51 dargestellt. Die Aufzeichnungen beginnen am Tag der Implantation des Senders. Die blaue Markierung repräsentiert den Zeitpunkt der Adenovirus-Applikation, und die darauffolgenden Tage das Experiment. Abbildung IV.51A zeigt die Verlaufskurven von zwei AdsFlt-1L behandelten Tieren. Deutlich ist der leichte Anstieg des Blutdruckes am Ende des Experimentes zu erkennen, verglichen mit dem Verlauf der Kurven vor der blauen Markierung. Der Druck des ersten Tieres AdsFlt-1L_1 stieg dabei auf 135 vs 126mmHg (Systole) bzw. 97 vs 89mmHg (Diastole), und der des zweiten Tieres auf 138 vs 121mmHg (Systole), bzw. 107 vs 104mmHg (Diastole). In Abbildung IV.51B hingegen fallen die Verlaufskurven leicht ab. Das hier dargestellte AdsFlt-1L/AdVEGF behandelte Tier zeigt einen starken kurzen Druckabfall zwei Tage nach adenoviraler Applikation von 135 auf 113mmHg (Systole), bzw. von 103 auf 71mmHg (Diastole). Das entspricht einer Veränderung des mittleren arteriellen Druckes (MAP) von 119 auf 90mmHg. Zwei Tage später normalisierte sich der Druck wieder auf 133mmHg (Systole) bzw. 102mmHg (Diastole), also entsprechend einem MAP von 113mmHg. Der Mittelwert am Ende des Experimentes verglichen mit Messungen vor Beginn ergab einen Wert von 122 vs 125mmHg (Systole) bzw. 93 vs 101mmHg (Diastole).

Ein zweites Tier mit gleicher Behandlung (Daten hier nicht gezeigt) starb an Tag 5 des Experimentes. Es zeigte an Tag 2 einen ähnlich starken Druckabfall, der sich jedoch nicht wieder stabilisierte wie bei dem soeben beschriebenen Beispiel. Diese Beobachtungen könnten auf die Expression von VEGF zurückgeführt werden, dass ja durch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid einen Blutdruckabfall bewirkt. Die massive Ausschüttung von VEGF in den Organismus hat eine Wirkung ähnlich der einer Bolus-Injektion, die schon bei verschiedenen *in-vivo* Experimenten letale Folgen hatte.

Zusammenfassend konnte durch AdsFlt-1L Infektion ein leichter Anstieg des Blutdruckes beobachtet werden, während die Co-Expression von sFlt-1L und VEGF einen leichten Abfall des Blutdruckes zur Folge hatte, wahrscheinlich ein Resultat der starken Wirkung von VEGF. Da hier lediglich die Ergebnisse von Stichproben dargestellt wurden sind diese Resultate unterstützend zu bereits erzielten Ergebnissen zu betrachten.

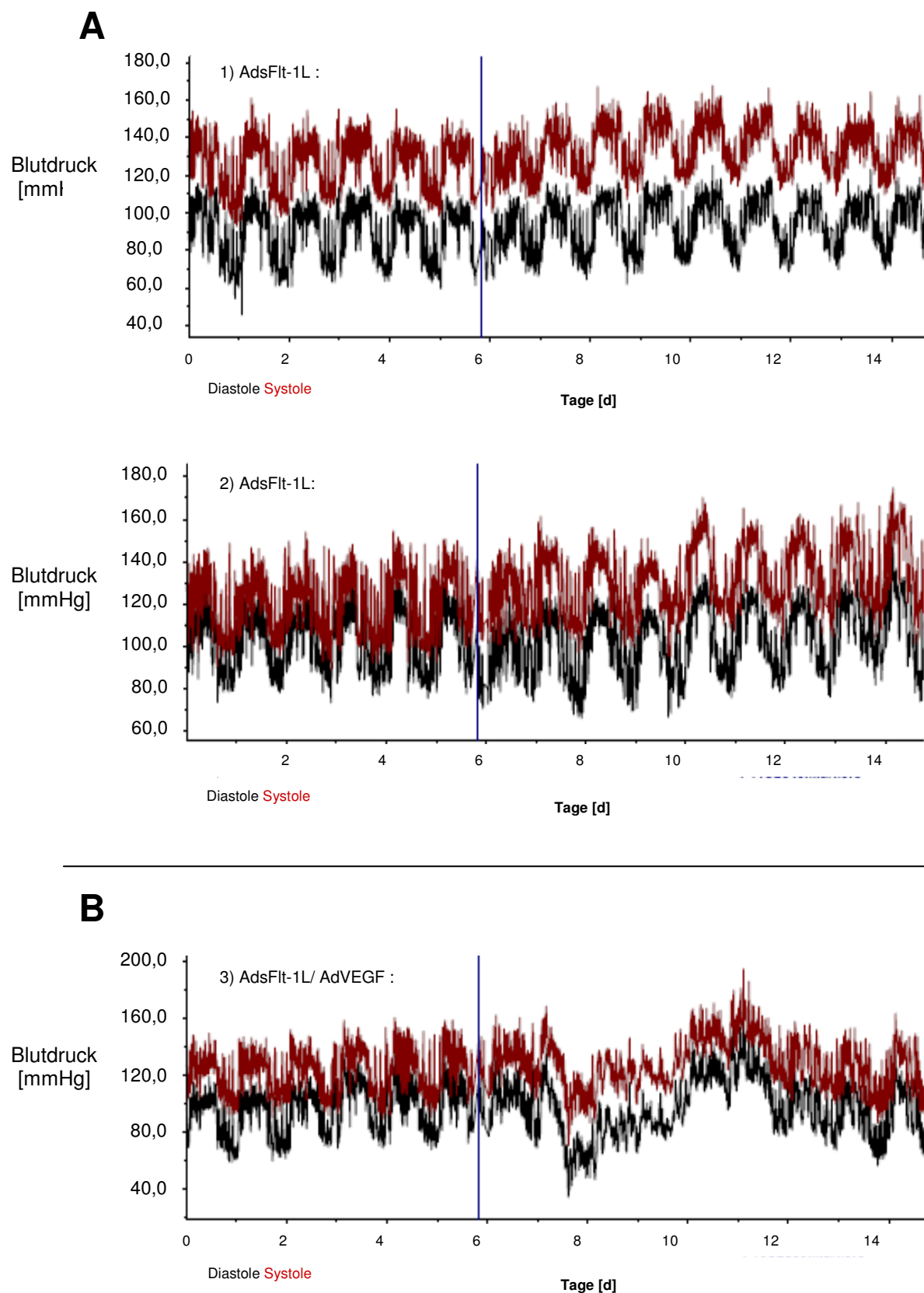


Abb. IV.51: Blutdruck-Verlaufskurven nach sFlt-1/ VEGF-A Co-Expression

A) Blutdruckverlauf von AdsFlt-1L behandelten Tieren: AdsFlt-1L_1 und AdsFlt-1L_2. **B)** Blutdruckverlauf eines AdsFlt-1L/AdVEGF behandelten Tieres. Rot- Systole, Schwarz- Diastole, blaue Markierung-Adenovirusapplikation.

3.2.7 Bindungsstudien zur Komplexierung von adenoviral exprimiertem sFlt-1 durch den neutralisierenden anti-Flt-1 Antikörper KM1750

Eine weitere Möglichkeit die sFlt-1 Aktivität zu unterbinden stellt der Einsatz von Antikörpern dar. Der Anspruch an solche Antikörper besteht darin, dass sie nicht nur das Protein markieren, sondern ebenfalls an der gleichen Stelle des Liganden, dem Epitop, binden um so den Signalweg zu unterbrechen. Für diese Studien wurde eine kleine Menge des neutralisierenden anti-Flt-1 Antikörpers KM1750 verwendet, der mit der zweiten homologen Immunglobulindomäne des Flt-1 interagiert (freundlicherweise bereitgestellt durch Prof. Masabumi Shibuya, und der Firma BIOVA, Japan).

Um diesen Antikörper im Tiermodell erfolgreich einsetzen zu können sollte als erstes nochmals sicher gestellt werden, dass KM1750 den Inhibitor sFlt-1 bindet. Des Weiteren musste die Affinität zwischen Antikörper und sFlt-1 überprüft werden, die einen annähernd hohen Wert wie den des Liganden zum Rezeptor aufweisen sollte, um auch *in-vivo* mit dem Liganden zu konkurrieren und diesen zu dominieren.

Zur Charakterisierung der Affinität des Antikörpers wurde ein Relida angewendet. Bei diesem Test werden Platten mit Antigen beschichtet und der Ligand und der Antikörper zugegeben. Ligand und Antikörper konkurrieren so um die Bindestelle am Rezeptor. Die Menge an gebundenem Liganden wird dann über ligandenspezifische Antikörper nachgewiesen, und so die Affinität des Antikörpers zum Rezeptor im Vergleich zum Liganden bestimmt. Der Nachweis einer geringen Konzentration an VEGF korreliert also mit einer guten Affinität zwischen dem Rezeptor und dem entsprechenden Antikörper.

Um eine bessere Aussage zur Affinität zu geben wurden, neben dem anti-Flt-1 KM1750, drei weitere Antikörper getestet. Zum einen der nicht neutralisierende anti-Flt-1 Antikörper r791, des Weiteren der bereits kommerziell erprobte anti-VEGF-Antikörper Avastin[®], und ein anti-VEGFR-2 Antikörper. Während anti-Flt-1 KM1750 und anti-Flt-1 r791 mit VEGF um die Bindestelle am Rezeptor konkurrieren, rivalisieren Avastin[®] und der anti-VEGFR-2 Antikörper um die Ligandenbindestelle.

Im vorliegenden Fall wurden ELISA-Platten mit rekombinantem sFlt-1(D6) beschichtet. Nach Blockierung und Waschen der Platte wurden die Antikörper in gleicher Konzentration zugegeben. Parallel erfolgte die Zugabe des Liganden VEGF (Abb. IV.52).

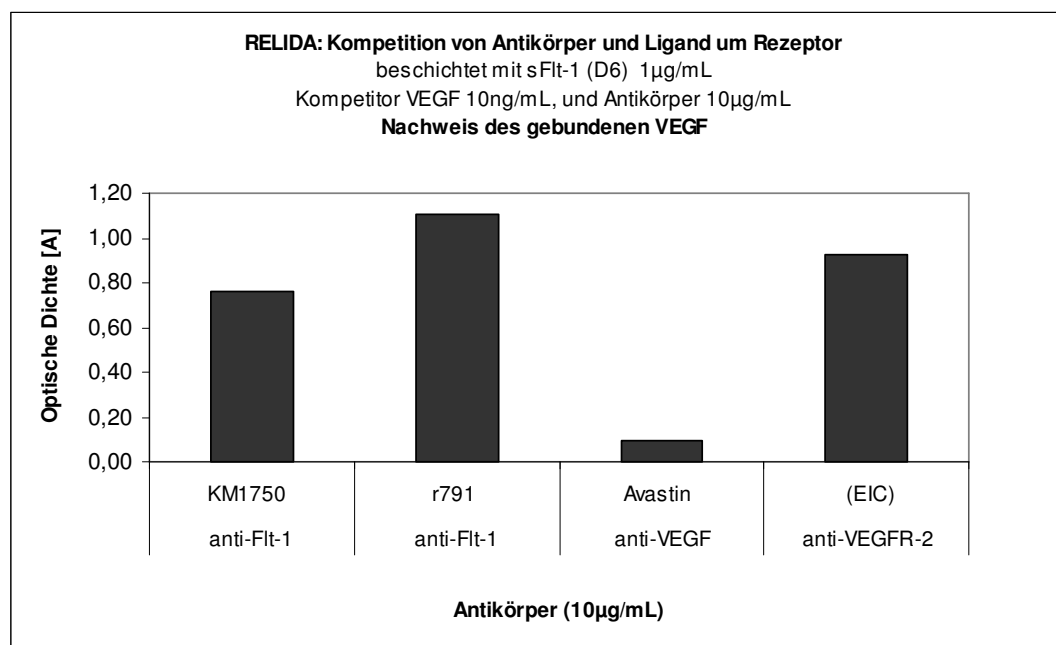


Abb. IV.52: Bestimmung der Affinität von Antikörpern

Bestimmung der Affinität des neutralisierenden anti-Flt-1 Antikörpers KM1750 im Vergleich zum anti-Flt-1 Antikörper r791 und einem anti-VEGF-Antikörper (Avastin[®]) sowie einem anti-VEGFR-2 Antikörper (EIC). Die dargestellten Werte sind repräsentativ für Mittelwerte aus zwei Proben.

Die Auswertung der Bindungsstudie ergab für den anti-Flt-1 KM1750 mit 0,76A eine höhere Affinität im Vergleich zu dem anti-Flt-1 r791 mit 1,08A. Der anti-VEGFR-2 zeigte mit 0,92A eine geringere Affinität zu VEGF als Avastin[®] mit 0,093A. Avastin[®] unterband durch hohe Affinität zu VEGF am stärksten die sFlt-1/ VEGF-Interaktion (Abb. IV.52).

Obwohl der anti-Flt-1 KM1750 Antikörper eine hohe Inhibierung der sFlt-1/ VEGF-Interaktion gegenüber dem anti-Flt-1 r791 und dem anti-VEGFR-2 Antikörper verzeichnete, ist diese Rate weitaus geringer als die des bereits *in-vivo* erprobten Avastins[®]. Zudem ist hier die Bindung an rekombinantem sFlt-1 Protein getestet worden, dass sich von natürlichem sFlt-1 unterscheidet. Nun musste am Tiermodell getestet werden, ob die Affinität des KM1750 ausreicht, *in-vivo* erfolgreich mit VEGF um die sFlt-1 Bindungsstelle zu konkurrieren.

3.2.8 Einfluß der Co-Administration des neutralisierenden anti-Flt-1 Antikörpers KM1750 auf sFlt-1 induzierte Effekte im Tiermodell

Neben der Möglichkeit der Blockierung der sFlt-1 Aktivität durch co-exprimiertes VEGF sollte die Blockierung durch den neutralisierenden Flt-1 Antikörper KM1750 untersucht werden. Die Bindung von rekombinantem sFlt-1 durch diesen Antikörper konnte bereits im zurückliegenden Kapitel beschrieben werden. Nun sollte gezeigt werden, dass die sFlt-1 Aktivität ebenfalls *in-vivo* beeinträchtigt wird, und Schädigungen vermindert auftreten.

Dazu wurden initiale Experimente durchgeführt. Die separate Applikation des Antikörpers resultierte in einer renalen Schädigung Grad 4-5 (n=2). Die Co-Applikation von 1180µg KM1750 zusammen mit $2,5 \times 10^9$ pfu AdsFlt-1 zeigte keinen schädigungsmindernden Effekt in der Nierenhistologie. So wiesen AdsFlt-1 infizierte Tiere eine durchschnittliche Schädigung von 2,3 (n=3) auf, während AdsFlt-1/KM1750 co-applizierte Tiere eine durchschnittliche Schädigung von 3 (n=3) zeigten, die keinen Trend zur Verminderung darstellt. Konzentrationsmessungen hinsichtlich der endogenen und exogenen Flt-1 Menge ergaben in der Leber für AdsFlt-1 behandelte Tiere 155,7 ng/mL/mg Protein (n=3) und für co-applizierte Tiere 261,7ng/mL/mgProtein(n=3). Im Plasma konnten für AdsFlt-1 infizierte Tiere Konzentrationen von 20,3ng/mL(n=3) und für co-behandelte Tiere 40,8ng/mL (n=3) belegt werden. Das zeigt, dass die Bindung von exogen exprimiertem sFlt-1 durch den KM1750 im Organismus nicht ausreichte, um einen Effekt zu sehen. Des Gleichen lassen die Messergebnisse aus Leber und Plasma vermuten, dass Flt-1 im co-behandelten Tier kaum gebunden wurde. Im Gegenteil, die Konzentrationen nach Co-Behandlung liegen höher als nach reiner AdsFlt-1 Infektion.

Im telemetrisch examinierten Tier konnte neben einem Blutdruckanstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks von 192 vs 123 mmHg eine Nierenschädigung mit Grad 9, und Flt-1 Konzentrationen in der Leber von 989 ng Flt-1/mg Gesamtprotein sowie im Plasma von 60ng/mL nachgewiesen werden. Diese Werte repräsentieren die obere Grenze der in sFlt-1 überexprimierenden Tieren gemessenen Resultate. Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass die sFlt-1 Aktivität hier nicht inhibiert wurde.

Da diese initialen Experimente zur Blockierung der sFlt-1 Aktivität durch den neutralisierenden Flt-1 Antikörper KM1750 eher kontroverse Ergebnisse lieferten, wurde von weiteren Untersuchungen Abstand genommen, und der Fokus auf die Blockierung durch VEGF gelegt.

3.3 Genexpression

Die Expression und die Effekte adenoviral transferierter Proteine auf Histologie und Physiologie konnte in den vergangenen Kapiteln demonstriert werden. Nun sollte noch geklärt werden, ob die Expression exogener Proteine über einen Zeitraum von zehn Tagen die Expression ausgesuchter endogener Proteine beeinflusste. Hierfür wurde semiquantitativ die Transkriptionsrate dieser Gene in Niere, Leber, Herz und Lunge überprüft. Aus den Organen wurde RNS präpariert, die anschließend in cDNS umgeschrieben wurde. Über RT-PCR erfolgte dann die Amplifikation der genspezifischen PCR-Produkte. Die Menge eingesetzter DNS wurde auf das konstant eprimierte Gen β -Actin normiert (Abb. IV.53).

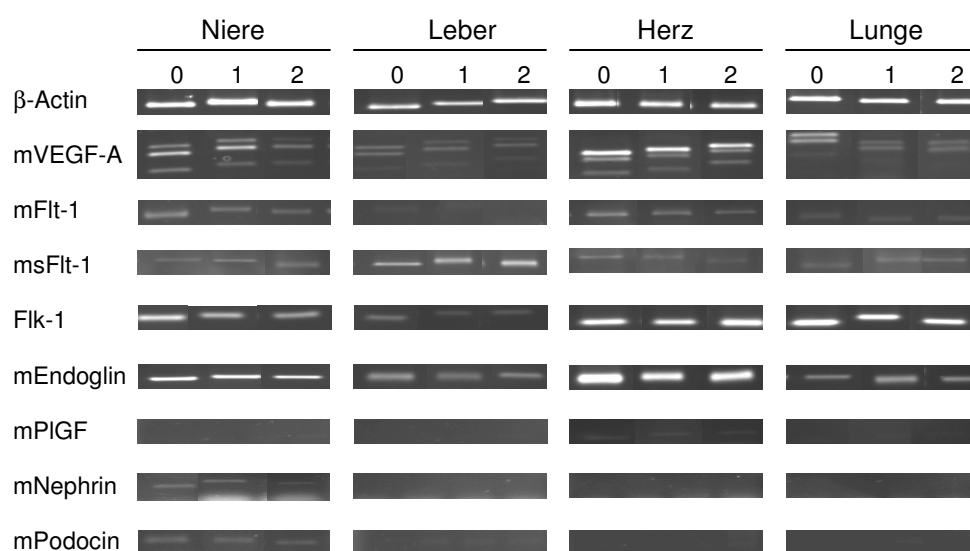


Abb. IV.53: Genexpression ausgewählter Gene nach sFlt-1 Überexpression und sFlt-1/ VEGF-A Co-Expression. Es wurden Gewebe von unbehandelten Tieren (n=4), von AdsFlt-1H behandelten Tieren (n=6) und von AdsFlt-1L/ AdVEGF behandelten Tieren (n=2) untersucht. 0=unbehandelt, 1=AdsFlt-1H, 2=AdsFlt-1L/ AdVEGF

Der Vergleich zeigte gewebsspezifische Regulationen einzelner Gene, wie einen Trend zur Hochregulation im Herzen für Flk-1 und murines Endoglin, sowie die erwartungsgemäße Expression von murinem Nephrin und Podocin ausschließlich in der Niere. Murines PIGF zeigte eine leichte Expression in Herz und Lunge, in Niere und Leber war es mit dieser Methode nicht nachweisbar. Im Falle von VEGF-A war eine isoformspezifische Neigung erkennbar, die sich ebenfalls bei einigen Organen zeigte. So schien im Herzen VEGF₁₈₈ zu dominieren. Die Expression des transmembranen Flt-1 erschien in der Leber niedriger als in den restlichen Organen, während die Expression des löslichen Flt-1 wiederum in der Leber stärker exprimiert erschien als in den anderen Geweben.

Der Vergleich zwischen den Zuständen „unbehandelt“, „AdsFlt-1H behandelt“ und „AdsFlt-1L/ AdVEGF“ behandelt zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression der ausgewählten Gene. Da diese Analysen semiquantitativ durchgeführt wurden, kann keine explizite Aussage zur Expression der Gene angeführt werden, sondern lediglich auf beobachtete Tendenzen verwiesen werden.

3.4 Therapeutische Optionen

Schon in früheren Arbeiten konnte am Rattenmodell demonstriert werden, dass ein Zusammenhang zwischen hohen Konzentrationen an sFlt-1 in der Zirkulation und präeklampsischen Symptomen wie Bluthochdruck, Nierenschädigung und Proteinurie besteht (Maynard et al. 2003). Im vorliegenden Modell an der Maus wurde sFlt-1 ebenfalls als Initiator dieser Effekte ermittelt.

Auf die humane Situation bezogen könnte sich demzufolge die Entfernung dieses Inhibitors aus der Zirkulation schwangerer präeklampsischer Frauen durchaus entlastend für die Betroffene, wenn nicht sogar therapeutisch wirksam zeigen.

Um die Grundlage dieser Hypothese zu untermauern wurden Experimente zur Bindung des sFlt-1 aus dem Plasma AdsFlt-1H behandelter Mäuse durchgeführt. Dabei erfolgte die Untersuchung zweier Mechanismen. Zum Einen die Depletion aus dem Plasma, und zum Anderen die Substitution in der Zirkulation.

Zur Depletion von sFlt-1 wurden Sepharose - Partikel mit murinem VEGF-A₁₆₄ oder monoklonalem anti-sFlt-1, und zur Kontrolle mit BSA beladen (Abb.IV.54). Über die so hergestellten Säulen wurde eine Plasmaprobe AdsFlt-1H behandelter Mäuse verteilt, über Nacht inkubiert, und die Konzentration des sFlt-1 nach den verschiedenen Behandlungen verglichen. Die Evaluierung des Gehaltes an sFlt-1 erfolgte sowohl vor als auch nach Passieren der Säulen. Mit 30,3ng/mL und 29,5ng/mL sFlt-1 befanden sich die Konzentrationen der Probe vor Passieren der Säule und nach Passieren der BSA-beladenen Säule auf dem gleichen Niveau. Die Messung der VEGF-A₁₆₄ und anti-sFlt-1 beladenen Säulen hingegen ergab Werte von 16,7ng/mL und 18,1ng/mL sFlt-1. Das entspricht einer Klärungsrate an sFlt-1 aus dem Plasma von 45% beziehungsweise 40%, und damit der Reduktion des sFlt-1 Spiegels um nahezu die Hälfte.

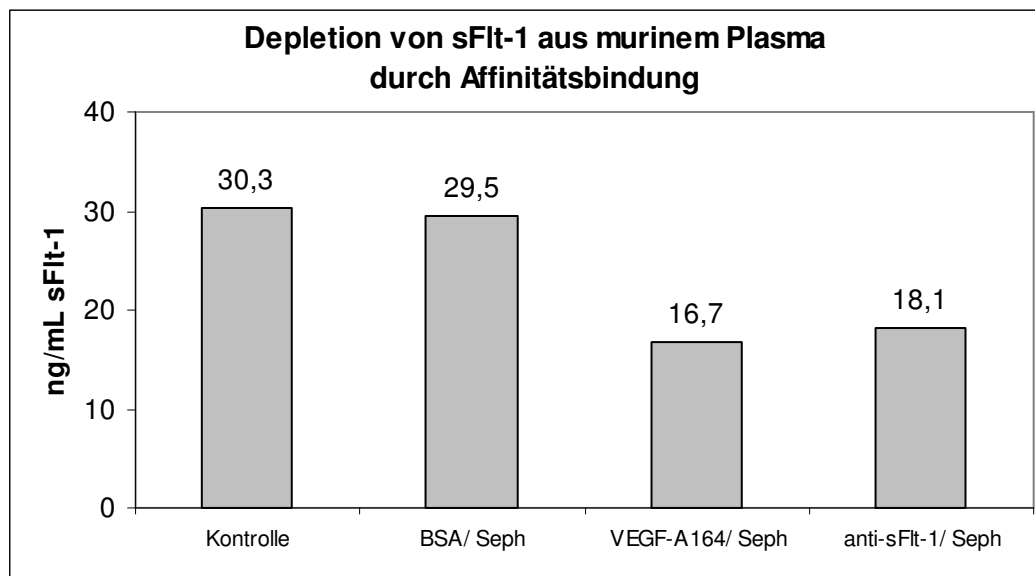


Abb. IV.54: Depletion von sFlt-1 aus murinem Plasma

Der Inhibitor sFlt-1 wurde aus murinem Plasma durch Bindung an affine Substanzen entfernt. Kontrolle: Plasmawert vor Säulenkontakt, BSA/Seph: Sepharosepartikel beladen mit bovinem Serum Albumin, VEGF-A164/Seph: Sepharosepartikel beladen mit murinem VEGF-A Isoform 164, anti sFlt-1: Sepharosepartikel beladen mit monoklonalem sFlt-1 Antikörper.

Die Experimente zur Substitution der sFlt-1 Aktivität mit VEGF wurden nach dem gleichen Schema durchgeführt wie die *in-vivo* Experimente zur Neutralisierung des sFlt-1 in Kapitel IV.3.2. Abweichend wurden jedoch den Tieren AdsFlt-1L/ AdVEGF mit einer Dosis von $2,5 \times 10^9$ pfu/ $1,5 \times 10^8$ pfu appliziert (Abb. IV.55). Im Leberlysät des AdsFlt-1L/ AdVEGF behandelten Tieres konnte nach Ablauf des Experiment eine Konzentration von 15,5ng/ml/mgProtein an sFlt-1 nachgewiesen werden, im Gegensatz zu den 183ng/mL/mgProtein im AdsFlt-1L behandelten Tier. Die Unterschiede im Plasma fielen weit geringer aus. So wurden 8,3ng/mL sFlt-1 im Plasma AdsFlt-1L/ AdVEGF-behandelter Tiere, und 21,1ng/mL im Plasma AdsFlt-1L behandelter Tiere detektiert. Damit betrug die Reduktion des freien sFlt-1 durch Komplexbildung mit co-exprimiertem VEGF in der Leber 91,5%, und in der Zirkulation 60,7%.

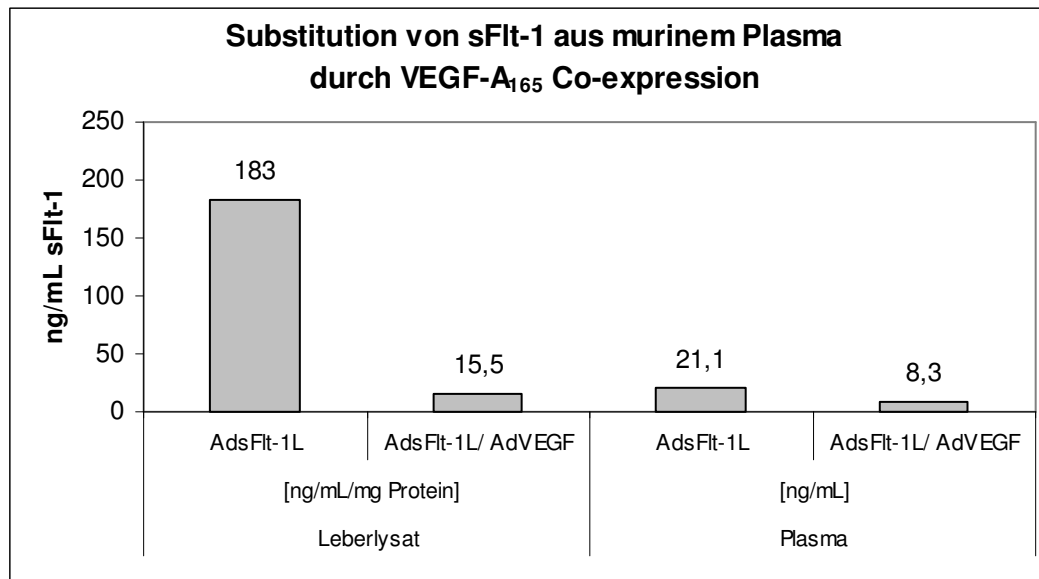


Abb. IV.55: Substitution von exprimiertem sFlt-1 mit co-exprimiertem VEGF im Tiermodell

Der Inhibitor sFlt-1 wurde zusammen mit seinem Liganden VEGF in der Maus adenoviral co-exprimiert. Anschließend wurden verbleibende sFlt-1 Konzentrationen in Leber und Zirkulation behandelter Tiere bestimmt. Zum Vergleich wurden monoinfizierte Tiere mit AdsFlt-1L herangezogen. AdsFlt-1L ($2,5 \times 10^9$ pfu), AdsFlt-1L/AdVEGF ($2,5 \times 10^9$ pfu/ $1,5 \times 10^8$ pfu)

Diese Versuche zeigen, dass die messbare Konzentration an aktivem Inhibitor durch die hier vorgestellten Mechanismen durchaus vermindert werden kann. Ob die Applikation eines so vielschichtig agierenden Wachstumsfaktors wie VEGF in der Zirkulation generell ratsam ist, darf angezweifelt werden. Die Methode der Depletion jedoch ließe sich zum Beispiel in Form der Filtration des Blutes, ähnlich der Nierendialyse, anwenden. Der komplizierte Zustand der Schwangerschaft würde so nicht durch interagierende Substanzen beeinflusst werden, und die Belastung wäre außerordentlich gering.

IV Diskussion

4.1 Das Mausmodell

Präeklampsie ist eine schwangerschaftsassozierte Erkrankung, die bei 5 – 10% aller Schwangerschaften auftritt (Shah et al. 2007). Trotz umfangreicher Forschung auf diesem Gebiet während der letzten 20 Jahre konnte die Ursache bislang nicht festgestellt werden. Eine ursächliche Beteiligung angiogener Faktoren wurde jedoch bereits im Rattenmodell beschrieben (Maynard et al. 2003). So konnte gezeigt werden, dass lösliches Flt-1 und lösliches Endoglin durch Bindung an VEGF-A und TGF- β 1 deren Signaltransduktion hemmen, und so Präeklampsie ähnliche Symptome im Rattenmodell hervorrufen (Venkatesha et al. 2006). Endoglin repräsentiert hierbei einen Co-Rezeptor von TGF- β 1. Dieser scheint eine Rolle bei der hereditären hämorrhagischen Telangiektasie Typ 1 (HHT 1) zu spielen, einer autosomalen Erkrankung die durch arteriovenöse Missbildungen charakterisiert ist (McAllister et al. 1994). Bei Präeklampsie scheint das lösliche Endoglin TGF- β 1 zu binden, die Signalvermittlung daraufhin zu unterbrechen, und so die Stimulation der VEGF-A Sekretion durch die Podozyten zu verhindern (Venkatesha et al. 2006). VEGF-A spielt vermutlich eine entscheidende Rolle bei Präeklampsie, da dieses Zytokin sowohl entscheidend zur Blutdruckregulation beiträgt, als auch zur Erhaltung des einfachen und fenestrierten Endothels. Die Symptomatik von Präeklampsie wird häufig vereinfacht als systemische endotheliale Dysfunktion beschrieben, der scheinbar eine Fehlregulation von VEGF-A zugrunde liegt (Venkatesha et al. 2006, Shah et al. 2007). Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, ein Mausmodell zu einer VEGF-A basierten systemischen endothelialen Dysfunktion zu etablieren, als ein Tiermodell zur Präeklampsie.

Ein Vorteil des Mausmodells, im Vergleich zum Rattenmodell, liegt in der geringen Größe des Versuchorganismus. Dieses Merkmal erlaubt die Anwendung exogener Substanzen mit Volumina, die um den Faktor 10 geringer ausfallen als im Rattenmodell. Hinzu kommt, dass immer noch eine weitaus größere Zahl an Methoden und Werkzeugen für die Detektion im Mausmodell zur Verfügung steht, im Vergleich zu anderen Tiermodellen. Ein weiterer Vorteil ist die Entschlüsselung des kompletten murinen Genoms. Diese Daten sind mit dem Zugang zu entsprechenden Datenbanken verknüpft, die über das Internet zur Verfügung stehen, und so ebenfalls ein verstärktes kommerzielles Angebot murin ausgerichteter molekularbiologischer und proteinbiochemischer Werkzeuge erlauben. Die Genomentschlüsselung ist ebenfalls Voraussetzung für einen entscheidenden Vorteil des Mausmodells gegenüber anderen Tiermodellen. Es existieren zahllose transgene

Mausmodelle, im Vergleich zu den vereinzelt transgenen Modellen beispielsweise für die Ratte. Trotz dieser Vorteile stellt die Maus kein ideales Modell zur humanen Situation dar. Sowohl die murine als auch die humane Plazenta sind zwar vom Typ her hämochorial, die Unterscheidung in Labyrinth- und Spongiotrophoblastenschicht erfolgt jedoch nur bei der murinen, nicht bei der humanen Plazenta (Hirashima et al. 2003). Des Weiteren ist der auslösende Mechanismus noch unklar, der Trophoblasten zur Sekretion hoher sFlt-1 Mengen veranlasst. Damit ist ebenfalls die exakte Ausgangssituation unklar, die zur Simulation eines krankheitsnahen Modells geschaffen werden müsste. Letztendlich sollte im vorliegenden Mausmodell lediglich der Effekt der hohen sFlt-1 Konzentration auf Niere und Blutdruck untersucht werden. Da im Rattenmodell dieser Effekt kaum Unterschiede zwischen trächtigen und nicht trächtigen Tieren aufwies, wurde für die Beantwortung dieser Fragestellung im Mausmodell ein nicht trächtiges Modell gewählt (Maynard et al. 2003).

Als Mittel des Gentransfers wurde die transiente Genexpression in Form der adenoviralen Überexpression angewandt. Diese Methode ermöglicht eine hohe Effizienz der Genexpression über einen relativ kurzen Zeitraum von 2 – 3 Wochen (Huber et al. 2000). Aufgrund des Vektortropismus transduzieren *i.v.* applizierte rekombinante Adenoviren überwiegend in der Leber (Jaffe et al. 1992). Eine Diskrepanz zwischen der eingesetzten viralen Dosis und der resultierenden Lebertransduktion, und damit auch der darauffolgender Proteinexpression, wurde bereits beschrieben und im vorliegenden Mausmodell ebenfalls beobachtet (Yang et al. 1994). Die Form der adenoviralen Genexpression konnte bereits erfolgreich im Tiermodell eingesetzt werden (Lu et al. 2007, Li et al. 2007). Aber auch zur Therapie von Krankheiten, wie zystischer Fibrose, fanden rekombinante Adenoviren bereits Anwendung (Morsy et al. 1999, Herweijer et al. 2003).

Die Nebenwirkungen der adenoviralen Infektion im Tiermodell werden kontrovers diskutiert. So wurden *in-vivo* bereits hepatotoxische Effekte beobachtet, während im Mausmodell einer *i.v.* applizierten adenoviralen Überexpression keine negativen Effekte verzeichnet werden konnten (Lieber et al. 1997, Mahasreshti et al. 2003).

Die im vorliegenden Modell erzielten Plasmakonzentrationen an sFlt-1 übertreffen mit bis zu 100ng/mL bei weitem die physiologisch auftretenden Konzentrationen bei humaner Präeklampsie von 4 bis 8 ng/mL (Maynard et al. 2003). Die Gruppe um Maynard führte zusätzlich Versuche durch, in denen sie verminderte Dosen an Adenoviren einsetzte und so die physiologische Konzentration bei humaner Präeklampsie simulierte (Maynard et al. 2003). Dabei beobachtete sie ebenfalls Präeklampsie ähnliche Symptome, die jedoch schwächer ausfielen. In initialen Experimenten wurden im vorliegenden Mausmodell ähnliche Versuche

durchgeführt. Auch hier konnten renale Schädigungen beobachtet werden (Daten hier nicht gezeigt). Um die Ursächlichkeit des sFlt-1 bei der Induktion Präeklampsie ähnlicher Symptome zu verdeutlichen, mußte eine stärkere und schnelle Antwort auf sFlt-1 Überexpression gezeigt werden. Diese wurde im vorliegenden Modell durch den Einsatz höherer adenoviraler Dosen erzielt. Kürzlich publizierte Daten beschreiben angeblich Plasmakonzentrationen in humaner Präeklampsie zwischen 60 und 13.000ng/mL (Venkatesha et al. 2006, Li et al. 2007). Diese Ergebnisse wurden von den Autoren auf veränderte Assaybedingungen zurückgeführt, die eine weit höhere Berechnung der Werte zur Folge haben (Li et al. 2007).

Studien an Tiermodellen, die evolutionär enger mit dem Menschen verwandt sind, wie zum Beispiel Primaten, sind nötig um den Mechanismus der Präeklampsie aufzuklären, und dem therapeutischen Nutzen der VEGF-A Applikation oder der anti-sFlt-1 Antikörper Behandlung nachzugehen. Im vorliegenden Mausmodell wurde lediglich ein Aspekt der Präeklampsie untersucht, der mit dem Auftreten der mütterlichen Symptome im Zusammenhang gebracht wird. Zur Klärung von Fragestellungen dieser Art stellt das Mausmodell einen geeigneten Modellorganismus dar, und ist ein guter Kompromiss zu anderen Modellen.

4.2 Die Bedeutung von sFlt-1 für die Plazenta

Der lösliche VEGFR-1 (sFlt-1) entsteht durch differentielles Spleißen aus dem Flt-1 Gen. Gegenüber dem transmembranen Flt-1 Rezeptor besteht die lösliche Form ausschließlich aus den 6 extrazellulären homologen Immunglobulindomänen (Kendall et al. 1993). Der lösliche Rezeptor ist damit in der Lage endokrin zu agieren, und seine Liganden VEGF-A/ PlGF mit der gleichen hohen Affinität wie die transmembrane Rezeptorvariante zu binden, ohne dabei ein Signal zu transduzieren. Im Falle der Schwangerschaftserkrankung Präeklampsie kommt es aus noch ungeklärten Gründen zur Mangel durchblutung der Plazenta, die einen hypoxischen Zustand induziert, als dessen Folge eine massive Expression und Sekretion von sFlt-1 einsetzt.

Im normalen Zustand ist die Plazenta ein schnell wachsendes, hoch vaskularisiertes Organ. Zu Beginn der Entwicklung steht die Nidation der Blastozyste im Vordergrund, gefolgt von dem Aufbau der Plazenta, deren Blutkreislauf schließlich an den des mütterlichen angeschlossen wird. Zum Ende der Schwangerschaft hin lässt das Wachstum der Plazenta dann nach. Die rasche Adaption der Plazenta an die Bedürfnisse des Fötus wird durch eine Vielzahl von Signalwegen reguliert. Zu diesen Regulatoren gehören auch der Rezeptor sFlt-1/ Flt-1 und dessen Liganden VEGF-A und PlGF, sowie der Rezeptor Endoglin (sEng/ Eng) (Venkatesha

et al. 2006). Die Konzentrationen dieser Zytokine verändern sich im Laufe der Schwangerschaft und tragen so zu den einzelnen Entwicklungsstadien der Plazenta bei. Messungen zu Beginn einer präeklampsischen im Vergleich zu einer normalen Schwangerschaft ergaben mit 6,4pg/mL *versus* 13,9pg/mL außerordentlich geringe Konzentrationen an freiem VEGF-A (Levine et al. 2004). Die Konzentrationen von freiem sFlt-1 und freiem PlGF hingegen lagen bei ca. 1.000pg/mL und 50pg/mL. PlGF stieg im 2. Trimester merklich auf 550pg/mL *versus* 700pg/mL an, zeigte dann zwischen der 29. und 32. Woche ein Maximum von 650pg/mL *versus* 950pg/mL, und fiel danach auf 250pg/mL *versus* 400pg/mL zurück. Die Konzentration von sFlt-1 blieb über die ersten zwei Trimester weitgehend konstant, um dann zwischen der 25. und 28. Woche beginnend bis zum Ende der Schwangerschaft auf 1.640pg/mL zu steigen. Bei Präeklampsie begann der sprunghafte Anstieg des sFlt-1 Spiegels 5 Wochen vor Einsetzen der klinischen Symptome, und stieg bis zu einer Konzentration von 4.380pg/mL (Levine et al. 2004). Vereinzelt wurden auch Konzentrationen von 8.000pg/mL beobachtet (Maynard et al. 2003). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass lösliches Endoglin (sEng), ein TGF- β 1 Co-Rezeptor, zum Ende der Schwangerschaft im Blut leicht erhöht ist (Venkatesha et al. 2006). Konzentrationsmessungen dieses Moleküls zeigten 8.000pg/mL zu Beginn der Schwangerschaft im 1. und 2. Trimester, die dann zwischen der 29. und 32. Woche von 8.000pg/mL auf 14.000pg/mL anstiegen. Von den Konzentrationsänderungen her betrachtet verhält sich sEng ähnlich sFlt-1. Im 1. Trimester lagen die sEng-Spiegel unverändert bei 8.000pg/mL um dann jedoch im 2. Trimester auf 18.000pg/mL zu steigen. Im letzten Trimester folgt dann ca. 5 Wochen vor dem Einsetzen präeklampsischer Symptome der sprunghafte Anstieg auf bis zu 56.000pg/mL (Levine 2006). Wird der Verlauf der Zytokinkonzentrationen verglichen, und pro- und antiangiogene Faktoren unterschieden, so stellt sich zu Beginn einer normalen Schwangerschaft der proangiogene Zustand zugunsten des Plazentawachstums dar (Levine et al. 2004). Freies VEGF-A liegt vermutlich überwiegend gebunden vor, da es nur in sehr geringen Mengen detektierbar ist. Die Konzentration an freiem PlGF hingegen steigt bis zum frühen 3. Trimester an. Ab dem Zeitpunkt wo sie fällt ist ein klarer Anstieg von sFlt-1 zu verzeichnen. Zum Ende der Schwangerschaft hin könnte also der proangiogene Zustand durch einen anti-angiogenen ersetzt werden, und so das Wachstum der Plazenta verlangsamen. Doch warum liegt freies PlGF in hohen Konzentrationen vor, im Vergleich zu den außerordentlich geringen Konzentrationen von VEGF-A? Zum Einen ist die Affinität von sFlt-1/ Flt-1 zu VEGF-A höher als zu PlGF. Aus diesem Grund könnte ein Großteil des VEGF-A durch sFlt-1 gebunden sein. Zum Anderen wird PlGF von der Plazenta viel stärker exprimiert als von

anderen Geweben (Barleon et al. 1994). Diese Beobachtung kann als Hinweis auf eine spezielle Funktion von PlGF in der Plazenta gedeutet werden. So wurde bereits gezeigt, dass PlGF eine Rolle bei der Trophoblastenmigration übernimmt (Zhou et al. 1997, Torry et al. 2003). Einen Einfluß auf die Migration dieser Zellen hat ebenfalls der TGF- β 1 Co-Rezeptor Endoglin. Dieser Rezeptor liegt sowohl transmembran als auch in löslicher Form vor, und wird von Endothelzellen und Synzytiotrophoblasten stark exprimiert. Beide Rezeptorformen können TGF- β 1 binden, wobei die lösliche Rezeptorvariante keine Signale transduziert. Dadurch beeinflussen beide Rezeptorvarianten die TGF- β 1 vermittelte Signalkaskade auf unterschiedliche Art und Weise. Caniggia et al. zeigten, dass die Inhibierung des transmembranen Endoglins eine erhöhte Migration und das Einwachsen der Trophoblasten in der Plazenta zur Folge hat (Caniggia et al. 1997). Das lösliche Endoglin könnte dabei als Antagonist fungieren (Venkatesha et al. 2006). In der humanen Präeklampsie konnten die beiden inhibitorisch agierenden Rezeptoren sFlt-1 und sEng in hohen Konzentrationen in der Plazenta nachgewiesen werden. Dabei war die für sEng detektierte Konzentration um fast das 13-fache höher als die des sFlt-1. Bislang konnte gezeigt werden, dass sFlt-1 VEGF-A und PlGF bindet, wobei die Affinität zu VEGF-A weitaus stärker ist als zu PlGF. Der Rezeptor bindet also vorrangig VEGF-A (Shibuya et al. 2006). Das lösliche Endoglin ist auch in der normalen Schwangerschaft um das 14-fache höher konzentriert als sFlt-1. Dieser Konzentrationsunterschied kann darauf zurückgeführt werden, dass sEng als Co-Rezeptor mit einer geringeren Affinität als sFlt-1 bindet, und nicht direkt an der Ligand-Rezeptor Interaktion beteiligt ist. Venkatesha et al. demonstrierten, dass sEng durch Bindung von TGF- β 1 die Freisetzung von VEGF-A hemmt, und so indirekt die VEGF-A vermittelte Blutdruckregulation beeinflusst (Venkatesha et al. 2006). Zudem ist es auch in der Lage andere Mitglieder der TGF- β -Familie zu binden, wie zum Beispiel BMP (Barbara et al. 1999). Das zeigt, dass sEng als Co-Rezeptor in der Plazenta ebenfalls vielfältige noch unbekannte Funktionen inne haben kann, deren Erfüllung möglicherweise eine hohe Konzentration dieses Moleküls erfordert. Der Anstieg des sEng zum Ende der Schwangerschaft hin kann die Migration und das Einwachsen der Trophoblasten in die Spiralarterien verstärken (Caniggia et al. 1997). So wird weniger das Wachstum der Plazenta unterstützt, als vielmehr die Vergrößerung des Lumens der Spiralarterien und damit die ansteigende Blutversorgung des schnell wachsenden Feten. Diese Eigenschaften geben sEng den Status eines möglichen Markers für Präeklampsie, und damit auch als möglichen Surrogatmarker bei einer Therapie. Nagamatsu et al. zeigte, dass die Sauerstoffsättigung in der Umgebung von Trophoblasten unterschiedlich ist, und sich je nach Gestationsphase und Lokalisation in der Plazenta ändert

(Nagamatsu et al. 2004). Unter hypoxischen Bedingungen konnte die Gruppe bei primären Trophoblasten einen Anstieg in der Expression von sFlt-1 und VEGF-A verzeichnen, die Expression von PlGF blieb unverändert. Messungen der Konzentrationen ergaben zwar erhöhte Plasmaspiegel an freiem sFlt-1 und totalem VEGF-A, die Werte an freiem VEGF-A jedoch lagen unterhalb der Nachweisgrenze. Die Konzentrationen an sekretiertem freiem PlGF befanden sich ebenfalls unterhalb des Detektionsniveaus. Die Sauerstoffsättigung scheint also die Aktivität der Trophoblasten zu regulieren, und damit auch die Migration und das Einwachsen dieser plazentalen Zellen zu beeinflussen. Paradoxerweise werden durch Hypoxie unter anderem proangiogenes VEGF-A als auch antiangiogenes sFlt-1 hochreguliert, wobei in der Präeklampsie die weitaus höheren Konzentrationen an sFlt-1 den Anstieg des VEGF-A möglicherweise neutralisieren (Nagamatsu et al. 2004). Sie vermuteten daher, dass sFlt-1 die Angiogenese mütterlicher Endothelzellen blockieren soll, um so die Verbindung des plazentalen und mütterlichen Kreislaufs zu ermöglichen und aufrecht zu erhalten (Nagamatsu et al. 2004).

Die These der verhinderten Gefäßschließung nach initialer Öffnung wird von einer Publikation der Gruppe um Eming et al. unterstützt (Eming et al. 2004). Sie verglichen gut heilende und chronische Wunden. Dabei beobachteten sie in chronischen Wunden eine fast 4-fach höhere Konzentration an sFlt-1 im Vergleich zu gut heilenden Wunden. Patienten mit chronischen Wunden wiesen zudem einen vergleichbar niedrigen sFlt-1 Plasmaspiegel auf. Diese Beobachtung veranlasste Eming et al. zu der Annahme, dass sFlt-1 lokal in der chronischen Wunde exprimiert und sekretiert werden muß (Eming et al. 2004). Eine Rolle bei der Wundheilung wurde ebenfalls für PlGF im Zusammenhang mit dem transmembranen Flt-1 Rezeptor diskutiert (Failla et al. 2000, Carmeliet et al. 2001). Diese Beobachtung könnte eine mögliche Parallele zu den hohen PlGF-Konzentrationen in der Schwangerschaft darstellen, denn die Plazenta kann auch als eine große Wunde betrachtet werden. Diese befindet sich an der Grenze zwischen maternalem und fötalem Gewebe, und wird nicht verschlossen, da Konzentrationen antagonistischer Moleküle, wie sFlt-1 und sEng sowie eventuell andere Inhibitoren, den Einfluß agonistischer Moleküle, wie VEGF-A und PlGF, dominieren. So wird ein antiangiogener Zustand geschaffen, der die Gefäße offen, und so den uteroplazentalen Kreislauf aufrecht erhält. Ein physiologisches Beispiel dafür wurde kürzlich publiziert. Ambati et al. zeigten an der avaskulären Cornea des Auges, dass überschüssiges sFlt-1 in der Cornea enthaltenes VEGF-A vollständig bindet und so eine Vaskularisierung verhindert (Ambati et al. 2006).

Makris et al. und andere Gruppen stellten fest, dass sich ein Ungleichgewicht zwischen der Erhöhung des sFlt-1 Plasmaspiegels und der Erhöhung der plazentalen sFlt-1 Expression besteht (Makris et al. 2007, Rajakumar et al 2005, Matsubara et al. 2005). Dieses Ungleichgewicht kann teilweise auf extraplazentale sFlt-1-Quellen zurückgeführt werden, die bei Präeklampsie ebenfalls erhöht sind. So beobachteten Rajakumar et al. bei peripheren Blutmonozyten einen starken Anstieg bei Präeklampsie. Diese Zellen sind in der normalen Schwangerschaft aktiviert und leicht erhöht, und exprimieren den Flt-1 Rezeptor. Der starke Anstieg dieser Monozyten bei Präeklampsie ist mit einer verstärkten Expression von Flt-1, und damit auch sFlt-1 verbunden, und kann damit eine zusätzliche sFlt-1 Quelle bei Präeklampsie darstellen (Rajakumar et al 2005). Dagegen spricht, dass unmittelbar nach der Geburt mit Abstoßung der Plazenta der sFlt-1 Wert drastisch absinkt. Eine weitere These des sFlt-1 Anstiegs mit immunologischem Hintergrund demonstrierten Matsubara et al. (Matsubara et al. 2005). Sie stellten fest, dass bei Präeklampsie IL-2 im Blut erhöht, und in deziduaem Gewebe nachweisbar ist. In Zellkulturexperimenten aktivierten die mit IL-2 in Berührung gekommenen dezidualen Lymphozyten natürliche Killerzellen, die daraufhin die Aktivität von co-kultivierten Trophoblasten zu inhibieren schienen. Matsubara et al. schlussfolgerten, dass IL-2 die zytotoxische Aktivität dezidualer Lymphozyten verstärkt. Als Folge kann es dann zur verminderten Trophoblastenmigration und verschlechterter Plazentaentwicklung, Ischämie, Hypoxie und letztendlich der hypoxiebedingten massiven Freisetzung von sFlt-1 kommen.

Diese Beispiele zeigen, dass die Plazenta zwar die Quelle für den überwiegenden Teil des sFlt-1 bei Präeklampsie darstellt, jedoch durchaus andere extraplazentale Quellen existieren, die ebenfalls zu den hohen sFlt-1 Spiegeln in der mütterlichen Zirkulation beitragen können.

Die Ätiologie des ansteigenden sFlt-1 bei Präeklampsie ist immer noch unbekannt (Karumanchi et al. 2007). Lediglich die Rolle des sFlt-1 bei der Induktion pathologischer Symptome im mütterlichen Organismus konnte in Tiermodellen demonstriert werden, und dazu sollte auch die vorliegende Dissertation dienen (Maynard et al. 2003, Li et al. 2007, Lu et al. 2007). In Zellkulturstudien wurde eine hemmende Wirkung des löslichen Rezeptors auf die Trophoblastenmigration und Differenzierung beobachtet (Ahmad et al. 2004, Zhou et al. 2002). Zwar kann sFlt-1 aufgrund der fehlenden Tyrosinkinase und der löslichen Struktur als reiner Inhibitor betrachtet werden. Jedoch ist diese Eigenschaft durchaus positiv zur Regulation anwendbar. Wie bereits im oberen Abschnitt erwähnt, demonstrierten Ambati et al., dass die Cornea des Auges VEGF-A enthält, das die Bildung von Gefäßen stimuliert. In der avaskulären Cornea lag dieser Wachstumsfaktor allerdings komplett gebunden an sFlt-1

vor und konnte so keine Gefäßbildung induzieren (Ambati et al. 2006). Genau das ist physiologisch gewünscht und hat einen großen evolutionären Selektionsvorteil. Die Autoren schlussfolgerten, dass VEGF-A im gebundenen Zustand als schnell verfügbare Quelle gehalten wird, die bei einer Verletzung dieses schwer zugänglichen Gewebes Vaskularisierung stimulieren, und so eine Versorgung der Wunde gewährleisten kann.

Diese Beobachtung veranschaulicht, dass sFlt-1 als hoch affiner Rezeptor von VEGF-A und lösliches Molekül Einfluß auf eine Vielzahl VEGF-A-abhängiger Prozesse ausüben kann, und so vielmehr eine Rolle als VEGF-A-Regulator zu übernehmen scheint, im positiven wie im negativen Sinne.

Am Ende der plazentalen Entwicklung wird VEGF-A vermutlich derart reguliert, dass Gefäße erhalten, jedoch nicht verschlossen werden. Der lösliche Rezeptor scheint damit eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Verbindung zwischen Mutter und Feten, zum Beispiel in Form einer großen Wunde, zu spielen.

4.3 Die Überexpression von sFlt-1 induziert Präeklampsie ähnliche Symptome

4.3.1 Die Überexpression von sFlt-1 induziert glomeruläre Endotheliose

Zu Beginn der Arbeiten lag lediglich ein Tiermodell in Form eines Rattenmodells vor (Maynard et al. 2003). Darin konnte gezeigt werden, dass ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen hohen lokalen sFlt-1 Plasmaspiegeln in der Ratte und den Symptomen besteht, die bei Präeklampsie im Menschen auftreten (Maynard et al. 2003). In diesem Modell wurden sFlt-1 induzierte Symptome sowohl in trächtigen als auch in nicht trächtigen Tieren nachgewiesen. Das hier entwickelte Mausmodell zur Präeklampsie basiert auf der sFlt-1 bedingten Induktion von präeklampsischen Symptomen in nicht trächtigen Tieren. Diese Untersuchungen sollen die Hypothese stützen oder verwerfen, dass endotheliale Dysfunktion die Ursache der in Präeklampsie beobachteten Symptome darstellen kann.

So konnte gezeigt werden, dass AdsFlt-1-Fc behandelte Mäuse einen starken Anstieg des löslichen Rezeptors in der Zirkulation verzeichnen. Bei der näheren Untersuchung wurden renale Schädigung, Proteinurie und Hypertension beobachtet, die durch die adenovirale Co-Expression von VEGF-A₁₆₅ weitestgehend neutralisiert wurden. Weitere Schädigungen lagen aller Wahrscheinlichkeit nach vor (z.B. in der Leber), waren jedoch nicht das Ziel dieser Untersuchungen.

Nach adenoviraler sFlt-1 Überexpression konnten deutliche Unterschiede in der renalen Histologie im Vergleich zu unbehandelten Tieren nachgewiesen werden. So zeigten

elektronenmikroskopische Untersuchungen der Glomeruli sFlt-1 behandelter Tiere das Schadensbild der bei Präeklampsie ebenfalls auftretenden schweren glomerulären Endotheliose. Größere Gefäße, wie Arteriolen waren von dieser Schädigung nicht betroffen (Prof. H. J. Gröne, pers. Mitteilung). Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse eines bereits erwähnten Rattenmodells zur Präeklampsie, in dessen Studien sowohl trächtige als auch nicht trächtige Tiere ähnliche Symptome nach adenoviraler sFlt-1 Behandlung zeigten (Maynard et al. 2003). Erst kürzlich wurden einige weitere Modelle zur Induktion von Präeklampsie in Tieren durch adenovirale sFlt-1 Überexpression veröffentlicht. Auch diese untermauern die Beobachtungen des vorliegenden Modells. So beobachtete die Gruppe um Venkatesha et al. als auch die Gruppe um Li et al. im Rattenmodell moderate bis schwere glomeruläre Endotheliose (Venkatesha et al. 2006, Li et al. 2007). Lu et al. berichtete von typisch renalen Läsionen im Mausmodell, die bei humaner Präeklampsie auftreten (Lu et al. 2007). Des Weiteren demonstrierte Makris et al. am trächtigen, nicht-humanen Primaten, dass die experimentelle Verminderung der plazentalen Blutversorgung durch Ligation der unilateralen uterinen Arterie zu Hypoxie führt und im frühen 3. Trimester unter anderem glomeruläre Endotheliose in der mütterlichen Niere bewirkt (Makris et al. 2007). Die Konzentration an sFlt-1 in diesem Primatenmodell in der Zirkulation war mit ca.13ng/mL im Vergleich zu ca.1,5ng/mL bei normaler Durchblutung signifikant erhöht. Da die Expression von Flt-1 durch Hypoxie hochreguliert wird, und die verminderte plazentale Blutversorgung zu einem ischämischen und damit ebenfalls hypoxischen Zustand in der Plazenta führt, kann diese experimentell herbeigeführte plazentale Ischämie als Ursache für die hohen sFlt-1 Konzentrationen in der Zirkulation angesehen werden (Makris et al. 2007).

Die Gruppe um Eremina et al. beschäftigte sich ebenfalls mit dem Effekt der VEGF-A Inhibierung in der Niere (Eremina et al. 2006). Sie untersuchten transgene Mäuse, die eine podozytenspezifische Deletion des VEGF-A Gens enthielten. Damit inhibierten sie die Sekretion von VEGF-A durch die Podozyten und auf diese Weise wurde auch die parakrine VEGF-A-Signaltransduktion beeinflusst. Die Tiere zeigten postnatale starke glomeruläre Endotheliose mit Lyse der Endothelzellschicht am Tag 3 postnatal, gefolgt von Mesangiolyse und Proteinurie am Tag 5 postnatal. Dieses Beispiel zeigt, dass nicht nur das glomeruläre Endothel, sondern auch das die Kapillarschlingen fixierende Mesangiom abhängig von parakrin sekretiertem VEGF-A der Podozyten ist. Das Mesangiom ist Teil des glomerulären Filtrationsapparates und steht, wie die anderen Komponenten auch, in unmittelbarem Kontakt aber auch in Abhängigkeit zu den Kompartimenten der Filtrationsbarriere.

Während der renalen Entwicklung sekretiert das glomeruläre Endothel PDGF-B und rekrutiert auf diese Weise PDGF- β –Rezeptor exprimierende mesangiale Vorläuferzellen. Selbst adulte Zellen des Mesangioms exprimieren den PDGF- β Rezeptor, und stehen so in direkter Abhängigkeit zum Endothel (Eremina et al. 2006). Das Fehlen von Ligand oder aktiviertem Rezeptor führt zu einer einzelnen ballonartigen Kapillare und dem kompletten Fehlen mesangialer perivaskulärer Zellen (Leveen et al. 1994, Soriano et al. 1994). Diese Ergebnisse von Eremina et al. zeigen deutlich, dass mesangiale Zellen entscheidend von Bedeutung für die Bildung des glomerulären Kapillarnetzes sind (Eremina et al. 2006). Zusätzlich konnte bereits demonstriert werden, dass endotheliales PDGF-B kritisch für die Rekrutierung mesangialer Zellen ist, da ein endothelspezifischer PDGF-B knock-out einen Phänotyp ergab, ähnlich dem einer vollständigen PDGF-B Deletion (KoitabashiY 1991, AntignacC 1989). Mesangiolyse wird bei glomerulären Erkrankungen beobachtet, denen eine primäre Schädigung des Endothels vorausgeht. Zu diesen zählt ebenfalls die thrombotische Mikroangiopathie (TMA), die ein typisches pathohistologisches Bild der Präeklampsie darstellt (Stillman et al. 2007, Koitabashi et al. 1991).

Im vorliegenden Modell wurde an Paraffinschnitten ein stark positives Signal bei der PAS-Reaktion im Glomerulum sFlt-1 behandelter Tiere beobachtet. Diese Reaktion färbt Mucopolysaccharide, die Teil der extrazellulären Matrix sind. Bei dem Ablösen der Endothelzellen von der glomerulären Basalmembran als auch bei Mesangiolyse wird extrazelluläre Matrix verstärkt freigesetzt (Eremina et al. 2006). Das deutliche Signal im PAS-gefärbten Paraffinschnitt könnte also die extrazelluläre Matrix abgelöster Endothelzellen und Mesangiomzellen markieren.

Ein weiterer Faktor bei der Interaktion glomerulärer und zellulärer Komponenten ist endotheliales TGF- β . Dieser Wachstumsfaktor stimuliert im Organismus unter anderem Angiogenese, indem er die Differenzierung von Perizyten und damit die Stabilisierung entstehender Gefäße vor allem durch Matrixbildung induziert (Ramsauer et al. 2002). Im murinen Glomerulum stimuliert endotheliales TGF- β unter anderem die Sekretion von VEGF-A durch die Podozyten, und induziert damit die parakrine VEGF-A-Signalkaskade. Der TGF- β 1 Co-Rezeptor Endoglin wurde kürzlich als Protein identifiziert, dessen lösliche Rezeptorvariante sEng eine entscheidende Rolle in der Ätiologie der Präeklampsie zu spielen scheint. Venkatesha et al. konnten zeigen, dass dieser lösliche Rezeptor in seiner Wirkungsweise der des sFlt-1 vergleichbar ist (Venkatesha et al. 2006). So ist beispielsweise die Expression beider Rezeptoren bei Präeklampsie in der Plazenta stark erhöht und verstärkte Serumspiegel von sEng und sFlt-1 korrelieren mit der Schwere der Krankheit. Die

adenovirale Überexpression von sEng induzierte fokale glomeruläre Endotheliose, eine Präeklampsie-typische schwache renale Läsion, während die adenovirale Co-Expression beider Rezeptoren einen synergistischen pathologischen Effekt in Bezug auf das Rattenmodell zeigte. So konnten bislang durch adenovirale sFlt-1 Überexpression zwar Präeklampsie-ähnliche Symptome wie glomeruläre Schädigung, Proteinurie und Hypertension induziert werden, das Merkmal der schweren Verlaufsform der Präeklampsie, das HELLP-Syndrom („hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet“) blieb jedoch aus. Die Co-Expression dieser beiden Inhibitoren hingegen zeigte genau diesen Effekt.

Die inhibierende Wirkung von sEng auf die TGF- β 1 Signalleitung wurde ebenfalls umfassend demonstriert, und die Gruppe um Venkatesha et al. wies sEng zusammen mit sFlt-1 einen entscheidenden Platz bei der Genese der Präeklampsie zu (Venkatesha et al. 2006). So scheint das Verhalten von sEng gegenüber TGF- β 1 dem von sFlt-1 gegenüber VEGF-A zu ähneln, nur das unterschiedliche Wege der Signaltransduktion betroffen sind, die ähnliche Resultate zeigen. Das spiegelte sich schon im Glomerulum dieses Rattenmodells wieder. Zum Einen wurde podozytär sekretiertes VEGF-A durch sFlt-1 gebunden und auf diese Weise inhibiert, zum Anderen wurde die Stimulation dieser Sekretion über Bindung von TGF- β 1 durch sEng inhibiert. Die proangiogene, erhaltende Wirkung von VEGF-A wurde so von zwei Seiten gehemmt. Da VEGF-A und TGF- β 1 unter anderem proangiogene Funktionen im Organismus übernehmen, und sFlt-1 und sEng ebenfalls endokrin agieren, aber von den betroffenen Zellen freigesetzt werden, kann dieser synergistische Effekt durchaus in anderen Bereichen des Organismus auftreten, was bei einer systemischen Belastung wie Präeklampsie der Fall sein kann.

Der Punkt, dass endotheliale Zellen des Glomerulums mittels TGF- β 1 die Sekretion von VEGF-A durch die Podozyten stimulieren oder gar regulieren, unterstreicht die Abhängigkeit dieser Zellen von diesem Wachstumsfaktor. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen VEGF-A in geringem Maße exprimieren und sekretieren (Maharaj et al. 2006, Lee et al. 2007). Im weiteren Verlauf wurde der Einfluß des endothelialen VEGF-A auf den murinen Organismus in Form einer endothelspezifischen Deletion dieses Gens untersucht. Die zirkulierende Menge an VEGF-A in der Kontrolle unterschied sich nicht von der des endothel-spezifischen knock-outs (VEGF^{ECKO}), was eine geringe Bedeutung des zirkulierenden VEGF-A vermuten lässt. Die Anzahl der endothelialen Fenestrierungen im Glomerulum zeigte sich beim VEGF^{ECKO} nur unwesentlich vermindert. Während in Endothelzellen von gesunden Mäusen eine Phosphorylierung des VEGFR-2/KDR beobachtet werden konnte, fehlte diese in Endothelzellen von VEGF^{ECKO}-Mäusen. Diese und

andere hier nicht zitierte überzeugende Experimente ließen Lee et al. darauf schließen, dass autokrines VEGF-A die Selbstregulation und damit das Aufrechterhalten der Funktion der Zelle ermöglicht (Lee et al. 2007). Dabei kann parakrine Signaltransduktion die der autokrinen nicht ersetzen, und autokrine Stimulation dient ausschließlich dem Überleben der Zelle (Lee et al. 2007). Als weitere Möglichkeit der intrakrinen Aktivierung wurden intrazelluläre Komplexe oder Endosomen genannt, wie sie für PDGF-B, TGF- β 1 und VEGF-Rezeptoren bereits vorausgesagt wurden (Betsholtz et al. 1984).

Endothelzellen scheinen also auch ohne parakrin agierendes VEGF-A überlebensfähig zu sein. Doch wie kommt es dann zu glomerulärer Endotheliose wie sie bei Präeklampsie beobachtet wird? Parakrin agierendes VEGF-A ist zur Erhaltung des fenestrierten Endothels erforderlich. Die Endothelzellen zeigen jedoch nicht nur Schäden wie das Ablösen von der glomerulären Zellmembran, sie lösen sich anscheinend vollständig auf. Der angiogene Inhibitor sFlt-1 ist nicht zellmembrangängig, kann also intrazellulär vorhandenes VEGF-A nicht inaktivieren. Möglicherweise spielen weitere noch unbekannte Faktoren außer VEGF-A eine Rolle, die speziell für das glomeruläre fenestrierte Endothel von Bedeutung sind, und für deren Präsenz intakte umgebende glomeruläre Komponenten unerlässlich sind, wie das Beispiel PDGF-B zeigt. Voraussetzung für eine funktionell intakte glomeruläre Filtrationsbarriere ist demnach das Zusammenspiel und der Kontakt aller beteiligten Komponenten.

4.3.2 Die Überexpression von sFlt-1 induziert Proteinurie

Proteinurie ist einer der wichtigsten Marker zur Diagnose renaler Schädigungen (Kalluri et al. 2006). Im hier etablierten Modell wurde bei sFlt-1 behandelten Tieren eine hohe Konzentration an Protein im 24h-Urin nachgewiesen, die zum Großteil aus dem Plasmaglobulin Albumin bestand. Im Gegensatz zu den mit Kontrollvirus behandelten Tieren ($0,071 \pm 0,03 \text{ mg/mL}$) umfasste die Albuminkonzentration dieser Tiere $42,5 \pm 5,21 \text{ mg/mL}$, eine Zunahme ca. um den Faktor 600.

Als eines der typischen Symptome für Präeklampsie konnte Proteinurie bereits in einigen Rattenmodellen nach adenoviraler sFlt-1 Überexpression nachgewiesen werden. So demonstrierte Maynard et al. nach Applikation von $1 \times 10^9 \text{ pfu}$ AdsFlt-1 eine Albumin/Kreatinin-Ratio von $6.920 \mu\text{g/mg}$ versus $62 \mu\text{g/mg}$ in trächtigen, und mit $12.940 \mu\text{g/mg}$ versus $138 \mu\text{g/mg}$ knapp das Doppelte des Albumingehaltes in nicht trächtigen Ratten (Maynard et al 2003). Venkatesha et al. applizierten $2 \times 10^9 \text{ pfu}$ AdsFlt-1 ebenfalls trächtigen Tieren, und wiesen eine Ratio von $2.290 \mu\text{g/mg}$ versus $186 \mu\text{g/mg}$ nach (Venkatesha et al. 2006). Die

Gruppe um Li et al. detektierte ca. 7.500µg/mg nach intravenöser Verabreichung von 2×10^{10} pfu AdsFlt-1 (Li et al. 2007). Diese Werte repräsentieren vergleichbare Resultate der einzelnen Gruppen. Eine andere Arbeitsgruppe applizierte CD-1 Wildtypmäusen rekombinantes sFlt-1 Protein, dessen Konzentration dem Zehnfachen des zuvor bestimmten zirkulierenden physiologischen VEGF-A-Spiegels entsprach. Die Menge des daraufhin im Urin detektierten Gesamtproteins entsprach in etwa dem Zweifachen des in Kontrollen bestimmten Gesamtprotein (Sugimoto et al. 2003). In einem weiteren Tiermodell wurde Glomerulonephritis (GN) untersucht (Hara et al. 2006). Um diese Situation zu simulieren wurde eine antikörperbedingte Schädigung der glomerulären Basalmembran herbeigeführt. Der Effekt der lokalen sFlt-1 Expression im femoralen Muskel durch Plasmid-DNS Applikation mit anschließender Elektroporation wurde in diesem Rattenmodell ebenfalls untersucht. Tiere die frei von GN waren, jedoch mit sFlt-1 behandelt wurden zeigten keine Proteinurie. Ein Grund dafür ist möglicherweise die lokale Applikation der Plasmid-DNS, und die daraus resultierende lokale Proteinexpression ohne systemische Effekte. Es konnte bereits gezeigt werden, das die intravenöse Applikation rekombinanter Adenoviren im Vergleich zur intraperitonealen Applikation eine sehr zuverlässige Methode darstellt, um einen hohen Plasmaspiegel an exogenem Protein zu erhalten (Mahasreshti et al. 2003). Die lokale Expression im Muskel kann sich ähnlich wie die Proteinexpression durch lokale intraperitoneale Applikation der Adenoviren verhalten.

Im einem Modell der experimentell induzierten uteroplazentalen Ischämie konnte neben den bereits erwähnten hohen sFlt-1 Plasmaspiegeln und der renalen Schädigung ebenfalls eine schwere Proteinurie nachgewiesen werden (Makris et al. 2007). Mit einer Gesamtprotein/Kreatinin-Ratio von 541mg/g lag der Proteingehalt dieses nicht-humanen Primatenmodells bereits im Bereich der pathologischen Konzentration des Menschen, einem Proteingehalt von >265mg/g. Die Messung der Albuminkonzentration zeigte einen ähnlichen Anstieg wie den des Gesamtproteins, und repräsentiert damit einen Großteil des Proteingehaltes wie es auch bei Präeklampsie beobachtet wird. Als Grund für diese hohen Konzentrationen wird in den Modellen die Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere angegeben, die vielfach durch elektronenmikroskopische Aufnahmen von fehlendem fenestrierten Endothel und okkludierten thrombotischen Kapillaren mit partieller Fusion der Podozyten belegt wird.

Doch wie gelangt ein so großes Protein wie Albumin in solchen hohen Konzentrationen in den Harn, wenn die glomeruläre Basalmembran, eine der drei Filtrationsbarrieren, morphologisch unverändert erscheint?

Im vorliegenden Modell konnte elektronenmikroskopisch gezeigt werden, dass sowohl das fenestrierte Endothel als auch die Podozytenschicht mit den Podozytenfortsätzen nach sFlt-1 Überexpression ihre Funktion verloren haben. Während Endothelzellen und Podozyten überwiegend filtrationsspezifische Aufgaben wahrnehmen, so erfolgt durch die glomeruläre Basalmembran die Filtration nicht nur größenselektiv, sondern auch ladungssensitiv (Moran et al. 2004). Im gesunden Glomerulum werden die negativ geladenen Blutplasmae Proteine von der stark negativen Basalmembran abgestoßen (Kalluri et al. 2006). Da sich die drei Komponenten der glomerulären Filtrationsbarriere in einer Abhängigkeit zueinander befinden, und so in ständigem Kontakt stehen, kann sich die Schädigung einer Komponente negativ auf die anderen Komponenten auswirken. Im Fall des geschädigten fenestrierten Endothels kann sich die Ladungsselektivität der Basalmembran derart verändern, dass die negative Ladung abnimmt und somit auch die ladungsselektive Filtration der Blutplasmae Proteine (Moran et al. 2004). Die negativ geladenen Proteine könnten so nahezu ungehindert die Basalmembran passieren. Es wurde bereits mehrfach berichtet, dass trotz unveränderter Podozytenfortsätze schwere Proteinurie auftreten kann (Sugimoto et al. 2003, Kalluri et al. 2006, Makris et al. 2007). Ebenso konnte gezeigt werden, dass bereits das fenestrierte Endothel trotz seiner relativ hohen Porenweite von 20-30nm bereits 95% aller zirkulierenden Proteine zurückhält (Ballermann et al. 2007). Diese Eigenschaft scheint auf zwei speziellen Komponenten zu beruhen, die das glomeruläre Endothel überziehen: eine Glykokalyx und eine Schicht von Glycoproteinen. Der Beitrag des fenestrierten Endothels zur glomerulären Permeabilität scheint also größer zu sein als bislang angenommen (Ballermann et al. 2007).

Da selbst in Modellen schwere Proteinurie nachgewiesen wurde, deren fenestriertes Endothel, Basalmembran und Podozytenfortsätze mikroskopisch unauffällig erschienen, wurden die glomerulären Podozyten- assoziierten Schlitzmembranmoleküle näher untersucht (Sugimoto et al. 2003). Dabei fiel auf, dass eines dieser Proteine, Nephrin, bei Proteinurie stark erniedrigt ist. Die genaue Untersuchung einer Nephrin defizienten Mutante zeigte dann auch schwere Proteinurie ohne eine mikroskopisch sichtbare Veränderung der glomerulär-kapillären Komponenten (Kalluri et al. 2006). Allerdings konnte die Nephrinverminderung ebenfalls bei der Schädigung des fenestrierten Endothels beobachtet werden (Kalluri et al. 2006).

Im vorliegenden Modell wurde massive Albuminurie nachgewiesen. Die semiquantitative Analyse der Nephrinexpression durch RT-PCR ließ jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen sFlt-1 behandelten und unbehandelten Tieren erkennen. Die hier beobachtete Albuminurie wird demzufolge auf die schwere Schädigung des fenestrierten Endothels und

der vermutlich damit verbundenen verminderten Selektivität der Basalmembran für Albumin zurückgeführt.

Im elektronenmikroskopischen Präparat konnte eine partielle Fusion der Podozytenfortsätze beobachtet werden, die mit einer verstärkten Adhäsion nahe gelegener Podozytenfortsätze einhergeht, und so eine Störung spezifischer Signalwege zur Folge hat, die sich ebenfalls negativ auf die Funktionalität der glomerulären Basalmembran auswirken kann (Kalluri et al. 2006). Die im vorangegangenen Abschnitt bereits beschriebenen Signalwege zwischen den Komponenten der glomerulären Filtrationsbarriere spielen dabei vermutlich eine entscheidende Rolle.

Im vorliegenden Modell wurde in einigen wenigen Tieren die Ansammlung von Bauchhöhlenflüssigkeit (Aszites) beobachtet, was jedoch nicht weiter analysiert wurde. Diese Tiere zeigten besonders schwere Nierenschäden mit vollständiger glomerulärer Endotheliose und Fusion der Podozytenfortsätze. Ähnliche Beobachtungen machten Mahasreshti et al. nach adenoviraler sFlt-1 Überexpression in Mäusen. Nach einer Zeitspanne von 22 bis 28 Tagen wurde in 30% der behandelten Mäuse Aszites diagnostiziert (Mahasresthi et al. 2003). Ein Rattenmodell mit induzierter vorgeschädigter glomerulärer Basalmembran und nachfolgender lokaler sFlt-1 Behandlung zeigte schwere Proteinurie verbunden mit Hypoproteinämie und dem massiven Auftreten von Aszites 56 Tage nach Applikation des Proteins (Hara et al. 2006). Eine wichtige Funktion des Plasmaproteins Albumin ist die Bindung von Wasser. So wird der kolloid-osmotische Druck des Blutes aufrecht erhalten, und ein Abfließen des Wassers in Gewebe verhindert. Aufgrund der starken Filtration von Albumin in der schwer geschädigten Niere kann der Albumingehalt im Plasma absinken. Ausdruck dieser Störung ist Aszites, in das Gewebe abgeflossene Plasmaflüssigkeit (Mahasreshti et al. 2003). Der vermutlich verminderte kolloid-osmotische Druck könnte ebenfalls zur morphologischen Veränderung der glomerulären Filtrationsbarriere beitragen.

Die Albuminsynthese findet ausschließlich in der Leber statt, und steht im Gleichgewicht mit dem Abbau von Albumin. Bei der Methode der adenoviralen Genexpression kommt es zur Vektor-Tropismus bedingten Akkumulation der Adenoviren in der Leber. Die Leberzellen werden viral transduziert und produzieren so das eingeschleuste exogene Protein. Sowohl die virale Infektion als auch die Produktion exogener Proteine stellen eine zusätzliche Belastung der Leberzelle dar. Hinzu kommt, dass die Leber als Drüse ebenfalls fenestriertes Endothel aufweist, dessen Funktion durch exogenes sFlt-1 beeinträchtigt wird. In stichpunktartigen Kontrollschnitten der Leber konnte eine Schädigung in Form von extramedullärer Hematopoese, dem Auftreten von Megalozyten sowie aktivierten Endothelzellen beobachtet

werden. Es ist möglich, dass diese Schädigung die Albuminsynthese beeinträchtigt. Andererseits spricht die Ausscheidung hoher Albuminkonzentrationen dagegen.

Die Leber war ebenfalls wie viele andere Organe nicht direkter Gegenstand der Analyse dieses Modells. Da die adenoviral überexprimierten Proteine endokrin agieren, kann ein systemweiter Einfluß auf andere Organe nicht ausgeschlossen werden. Diese Arbeit fokussiert auf Schädigungen der Niere und weitere Symptome der Präeklampsie, wie Proteinurie und Hypertension. Darüber hinausgehende Auswirkungen wurden nicht betrachtet, und werden demzufolge auch nicht diskutiert.

4.3.3 Die Überexpression von sFlt-1 induziert Hypertension

Die Erhöhung des Blutdruckes stellt ein weiteres Merkmal der schwangerschaftsbedingten Krankheit Präeklampsie dar, und kann als Folge der endothelialen Dysfunktion durch das massive Auftreten von sFlt-1 angesehen werden (Maynard et al. 2003).

Der Vergleich des mittleren arteriellen Blutdruckes im vorliegenden Modell von Tieren vor und nach adenoviraler sFlt-1 Behandlung zeigte einen Anstieg um 26%. Kontrollvirus behandelte Tiere hingegen wiesen einen leichten Abfall auf.

Ähnliche Ergebnisse konnten in trächtigen und nicht trächtigen Ratten gezeigt werden, wo sich die Zunahme des mittleren arteriellen Blutdrucks zwischen 23% und 31% bewegte (Maynard et al. 2003, Venkatesha et al. 2007, Gilbert et al. 2007, Li et al. 2007). Der Blutdruck von trächtigen Tieren lag hier niedriger als der nicht trächtiger Tiere (Maynard et al. 2003). Ein Grund dafür kann die plazentabedingte höhere Konzentration von PlGF in der Zirkulation trächtiger Tiere sein, einem weiteren sFlt-1 Liganden. Dieser kann sFlt-1 binden, und so die Menge an zirkulierendem sFlt-1 und die damit verbundenen Effekte vermindern.

In einem weiteren Tiermodell zur Präeklampsie wurde der Blutdruck nach adenoviraler sFlt-1 Überexpression wie im vorliegenden Modell telemetrisch bestimmt (Lu et al. 2007). Bei der Untersuchung von trächtigen und nicht trächtigen Mäusen ergab sich eine Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdruckes um 23% in trächtigen Tieren. Der Blutdruck nicht trächtiger Tiere zeigte hier keine Veränderung. Die Gruppe um Lu et al. begann mit der telemetrischen Blutdrucküberwachung 2 Tage nach Implantation des Senders. Trächtige Tiere wurden über einen Zeitraum von 8 Tagen beobachtet und zeigten erst ab Tag 7 einen Blutdruckanstieg. Die telemetrische Überwachung nicht trächtiger Tiere erfolgte lediglich über einen Zeitraum von 3 Tagen. Innerhalb dieser Zeitspanne konnte keine Änderung des Blutdruckes beobachtet werden. Der Blutdruck erhöhende Einfluß von sFlt-1 in nicht trächtigen Ratten konnte bereits demonstriert werden (Maynard et al. 2003). Im vorliegenden Mausmodell begann der

Blutdruck bereits einen Tag nach Adenovirusapplikation zu steigen. Die Ergebnisse nach 10 Tagen telemetrischer Observierung aus der vorliegenden Arbeit gehen mit denen von Maynard et al. konform. Es ist möglich, dass das Resultat von Lu et al. bei der Blutdruckmessung in nicht trächtigen Tieren mit der abgeänderten Versuchsanordnung erklärt werden kann.

Li et al. beobachteten eine Blutdruckerhöhung nach adenoviraler sFlt-1 Überexpression im trächtigen Rattenmodell. In der anschließenden Diskussion zitierten sie als Ursache unter anderem Barorezeptoren als mögliche Kandidaten (Li et al. 2007). Barorezeptoren sind Druckrezeptoren, die sich am Aortenbogen und einem Teil der *A. carotis* befinden. Sie regulieren den Blutdruck beispielsweise beim Übergang vom Liegen zum Stehen, währenddessen ein größeres Blutvolumen bewegt werden muß. Sie gelten als Langzeitregulatoren. In der zitierten Studie wurden nur leicht verminderte VEGF-A₁₂₁ - Plasmaspiegel detektiert, und daraufhin die Baroreflexantwort als möglicher operativer Mechanismus in Betracht gezogen. Im hier diskutierten Mausmodell befand sich der VEGF-A₁₆₅ - Plasmaspiegel unterhalb der Detektionsgrenze des ELISA von 31pg/mL. Das kann vielfältige Ursachen haben. Im Gegensatz zum sFlt-1 Konstrukt enthält das VEGF-A-Konstrukt keinen stabilisierenden fusionierten Fc-Anhang, kann also schneller in der Zirkulation abgebaut werden. Des Weiteren könnten bereits gebildete Komplexe von sFlt-1 und VEGF-A schneller abgebaut werden als das freie Protein, oder vermindert durch den ELISA detektiert werden, wie bereits gezeigt wurde (Maynard et al. 2003). Da jedoch parallel zur Blutdruckänderung massive Schäden des glomerulären Endothels auftraten, die nicht primär auf eine Druckänderung zurückgeführt werden können, wird der Mechanismus der Barorezeptoren als mögliche Ursache für die beobachteten Blutdruckveränderungen ausgeschlossen.

Zu den Kurzzeitregulatoren des Blutdruckes gehört der Endothel-vermittelte Stickstoffmonoxid-Ausstoß. Stickstoffmonoxid (NO) bewirkt die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und damit eine Blutdrucksenkung (Kroll et al. 2000). VEGF-A kann die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) induzieren, die daraufhin die Freisetzung von NO initiiert. Da der angiogene Inhibitor sFlt-1 systemisch vorhanden ist und endokrin agiert, ist er in der Lage parakrin agierendes VEGF-A in seiner Aktivität an verschiedenen Bereichen des Körpers lokal zu beeinflussen. Da dies an mehreren Stellen gleichzeitig möglich ist, kann diese Inhibierung durchaus eine starke Blutdruckänderung zur Folge haben. Die Gruppe um Lee et al. beschäftigte sich ebenfalls mit einer Form der VEGF-A Depletion, und untersuchte transgene Mäuse mit einem Gendefekt für endothelial, also autokrin

sekretiertes VEGF-A (VEGF^{ECKO}; Lee et al. 2007). Der Phänotyp zeigte zwar unter anderem thrombotische Ereignisse und intestinale Perforation, jedoch konnten keine Veränderungen in der Aktivität der eNOS nachgewiesen werden, die auch durch VEGF-A reguliert wird. Der Blutdruck erschien unverändert. Diese Beobachtung zeigt, dass die Blutdruckregulation über die VEGF-A stimulierte eNOS unabhängig von autokrin sekretiertem, und damit abhängig von parakrin sezerniertem VEGF-A ist, aber parakrin reguliert wird.

Venkatesha et al. beobachteten ebenfalls eine Blutdruckerhöhung in ihrem trächtigen Rattenmodell, sowohl nach adenoviraler sFlt-1 Überexpression, als auch adenoviraler Überexpression des löslichen TGF- β Co-Rezeptors sEndoglin (Venkatesha et al. 2006). Die Blutdruckänderung war jedoch stärker ausgeprägt nach Co-Expression beider Rezeptoren. TGF- β 1 induziert Vasorelaxation durch die Aktivierung von eNOS, genauer durch die Dephosphorylierung des Tyrosinrestes Tyr495 der eNOS. VEGF-A repräsentiert ebenfalls ein Vasorelaxant durch Aktivierung der eNOS. Jedoch bewirkt VEGF-A die Phosphorylierung des Serinrestes Ser1177. Die Koordinierung dieser Reaktionen bestimmt die Aktivität der eNOS in den Endothelzellen (Venkatesha et al. 2006). Ähnlich wie bei der stimulierten VEGF-A-Sekretion der Podozyten wird auch die eNOS von zwei Seiten aktiviert, durch TGF- β 1 und VEGF-A. Die löslichen Inhibitoren sEndoglin (sEng) und sFlt-1 binden die Wachstumsfaktoren TGF- β 1 und VEGF-A, und blockieren so die physiologische NO-abhängige Vasodilatation. Damit tragen sie zur Entwicklung der Hypertension bei Präeklampsie bei.

Der lösliche Rezeptor sEng wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Neueste Ergebnisse zeigten jedoch, dass sFlt-1 als auch sEng unter hypoxischen Bedingungen hochreguliert sind (Martina Monti, pers.Kommunikation). Aufgrund seiner Expression nicht nur durch Trophoblasten der Plazenta sondern auch durch Endothelzellen kann sEng möglicherweise ebenso im vorliegenden Modell zu den beobachteten Effekten beigetragen haben, wenn auch in abgeschwächter Form verglichen mit der Co-Expression der zitierten Arbeit.

Der Blutdruckanstieg im vorliegenden Modell könnte also auf die sFlt-1 bedingte veränderte Regulation der eNOS und dem damit verbundenen Absinken des endothelial sekretierten NO zurückgeführt werden. Um diese These zu prüfen sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, die in dieser Arbeit nicht gemacht wurden.

4.4 Die Co-Transfektion von VEGF-A vermindert *in-vivo* sFlt-1 induzierte Symptome

Die Komplexbildung der Wachstumsfaktoren mit ihren löslichen Rezeptoren führt zur Reduktion der Bioverfügbarkeit dieser Faktoren. Dieser Vorgang ist ein wichtiger regulatorischer Mechanismus zur Erhaltung der angiogenen Balance, und wurde vor kurzem eindrucksvoll in der avaskulären Cornea analysiert (Ambati et al. 2006). In den durchgeführten *in-vitro* Komplexbildungsstudien konnte eine Reduktion des freien sFlt-1 durch Bindung an co-exprimiertes VEGF-A von bis zu 90% erreicht werden. Dabei wurde deutlich, dass bereits ein Bruchteil des adenoviral co-exprimierten VEGF-A ausreicht adenoviral exprimiertes sFlt-1 zu vermindern, bezogen auf den adenoviralen Titer (Abb.IV.30). Messungen im Zellysat co-transfizierter Zellen zeigten zudem einen starken Abfall des freien sFlt-1 Spiegels bis auf ein Zehntel der bei AdVEGF Monoinfektion detektierten Menge (Abb.IV.31). Die Komplexbildung zwischen sFlt-1 und VEGF-A schien also *in-vitro* bereits in der Zelle stattgefunden zu haben.

Aufgrund der stark letalen Wirkung bereits geringer Dosen an AdVEGF lagen völlig neue Voraussetzungen für die Situation im Tiermodell vor (Thurston et al. 2000). Die gewählte Menge an AdsFlt-1 musste sowohl einen Effekt im Tier hervorrufen, als auch durch geringe Dosen an VEGF-A kompensiert werden. Aussagekräftige *in-vivo* Ergebnisse wurden letztendlich mit einem 35-fachen Überschuss an AdsFlt-1 erzielt. Dieses Verhältnis bezieht sich allerdings auf den Virustiter und lässt weder einen Rückschluss zu, wie effizient die beiden Proteine in der Leber gebildet werden, noch wie die Komplexe tatsächlich aussehen. Ein VEGF-A₁₆₅ Molekül könnte zum Beispiel zwei sFlt-1 Monomere binden. So detektierte Hornig et al. bei Messungen im Überstand von nicht stimulierten HUVE-Zellen eine 10-fach höhere Konzentration an sFlt-1 verglichen mit der von VEGF-A (Hornig et al. 2000). Ebenso lag nach Infektion von A549-Zellen mit AdsFlt-1 oder AdVEGF zu je gleichen viralen Dosen die gemessene Proteinkonzentration für sFlt-1 um den Faktor 20 höher als die des VEGF-A (vgl. Abb. IV.30 und IV.33). Die Gruppe um Sugimoto et al. führte Messungen in der Zirkulation von unbehandelten Mäusen durch, die 65pg/mL für freies VEGF-A ergab (Sugimoto et al. 2003). Im vorliegenden Mausmodell lag die Plasmakonzentration unbehandelter Tiere sowohl für sFlt-1 als auch für VEGF-A unterhalb der Detektionsgrenze. Nach Co-Expression konnte im Tiermodell eine signifikant verminderte sFlt-1 Menge in Leber, Plasma und Urin behandelter Tiere detektiert werden. Das kann zum Einen daran liegen, dass die Zelle weniger Protein produziert. Zum Anderen können gebildete Komplexe

schnell zerfallen, und so nicht mehr nachgewiesen werden. Eine weitere Möglichkeit liegt im Nachweissystem. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der angewendete kommerzielle ELISA überwiegend freies sFlt-1 und freies VEGF-A nachweist, also komplexiertes Protein nicht erkennt (Maynard et al. 2003). Im Gegensatz zum Tiermodell erfolgt die Sekretion von sFlt-1 in der humanen präeklampsischen Situation durch die Trophoblasten der Plazenta, und gelangt dann in die mütterliche Zirkulation und die Gewebe. In der humanen Situation wird VEGF-A wahrscheinlich in vielen Organen gleichzeitig gebunden, überall da wo es stark exprimiert wird. Das wird auch durch die systemische endotheliale Dysfunktion bei Präeklampsie untermauert. Da der Effekt der Messung einer erheblich reduzierten sFlt-1 Konzentration nach Co-Expression bereits in Zellkulturversuchen mit A549-Zellen beobachtet werden konnte, kann daher die ineffiziente sFlt-1 Sekretion durch die Leber als mögliche Ursache für verminderte sFlt-1 Plasmaspiegel ausgeschlossen werden. Das zeigt, dass die Komplexbildung bereits in der Leber und dem Plasma stattgefunden hat.

Die Auswirkungen der Komplexbildung spiegeln sich ebenfalls in der Nierenhistologie wieder. Während sFlt-1L behandelte Tiere eine deutliche Schädigung des fenestrierten Endothels zeigten (Grad 4,8), wiesen Tiere mit Co-Expression nur vereinzelt eine leichte Schädigung des Glomerulums auf (Grad 1,8) und zeigten sich histologisch eher unauffällig. Bei der Betrachtung der Albuminkonzentration im Harn konnte nach Co-Expression eine fast vollständige Reduktion (um 99%) der Albuminausscheidung beobachtet werden. Die Bestimmung der Albumin/ Creatinin Ratio bestätigte dieses Resultat. Es galt bei diesen Experimenten also einen schmal gefassten Grenzbereich zu treffen. Oberhalb dieses Bereiches zeigte die Dosis verabreichter Viren eine letale Wirkung, und unterhalb keinen pathologischen Effekt im Tier.

Die positive Wirkung von VEGF-A auf die Niere konnte bereits durch Shimizu et al. gezeigt werden (Shimizu et al. 2004). Diese Arbeitsgruppe arbeitete mit einem Rattenmodell experimentell induzierter Glomerulonephritis. Dabei wurde die Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere durch die Anwendung eines Antikörpers erzielt, der gegen eine Komponente der glomerulären Basalmembran (GBM) gerichtet war. Die systemische Anwendung von VEGF-A₁₆₅ sieben Tage nach Schädigung der GBM reduzierte signifikant die zuvor beobachteten Effekte wie Proteinurie und glomeruläre Schädigung (Shimizu et al. 2004).

Wie kürzlich gezeigt wurde, kann die Komplexbildung von hohem exogenem sFlt-1 ebenfalls durch die Applikation von VEGF-A₁₂₁ erzielt werden. In einem Rattenmodell zur Präeklampsie mit adenoviraler sFlt-1 Überexpression wurde humanes rekombinantes VEGF-

A₁₂₁ über einen Zeitraum von sechs Tagen ein- oder zweimal täglich jungen Ratten subkutan injiziert (Li et al. 2007). Dabei kamen Dosen bis zu 400µg/kg VEGF₁₂₁ zur Anwendung. Diese Behandlung reduzierte sichtbar die für Präeklampsie charakteristischen Symptome, wie Bluthochdruck, glomeruläre Endotheliose und Proteinurie. Trotz der Anwendung gleicher Methoden und Anbieter lag die gemessene Konzentration an zirkulierendem sFlt-1 in den Tieren 10- bis 100-fach höher als zuvor für dieses Präeklampsiemodell berichtet wurde (Maynard et al. 2003, Li et al. 2007). Im Gegensatz zum vorliegenden Modell erfolgte die Applikation von VEGF-A nicht parallel, sondern in Form von Protein drei Tage nach adenoviraler sFlt-1 Transduktion. Jedoch zeigen beide Arbeiten, dass die Anwendung von exogenem VEGF-A in zwei unterschiedlichen Modellen, sowohl im Mausmodell als auch im Rattenmodell Symptome kompensiert, die durch hohe sFlt-1 Konzentrationen induziert wurden. Diese Beobachtungen verstärken die These, dass sFlt-1 ursächlich diese Symptome induziert.

VI Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die adenovirale Überexpression von sFlt-1 im Mausmodell Präeklampsie ähnliche Symptome hervorruft, wie Hypertension, renale Schädigung und Proteinurie. Durch die adenovirale Co-Expression von VEGF-A₁₆₅ konnte die Bindung des exogenen sFlt-1 durch VEGF bereits am Ort der Expression demonstriert werden. Diese frühzeitige Komplexbildung zeigte sich unter anderem durch das Fehlen der zuvor bei Monoinfektion beobachteten Präeklampsie ähnlichen Symptome.

Zukünftige Studien des hier etablierten Mausmodells könnten ebenfalls dazu dienen, die Regulation des VEGFR-2/ KDR/ Flk-1 nach dem Antagonisieren von VEGF-A zu untersuchen. Aufgrund der Löslichkeit des sFlt-1 kommt es zur lokalen Inhibierung von VEGF-A in verschiedenen Geweben. Der VEGFR-2 sollte demnach in diesen Geweben, wie zum Beispiel der Niere, der Lunge oder der Leber, herunterreguliert sein als Antwort auf verminderte VEGF-A Spiegel.

In der vorliegenden Arbeit wurde demonstriert, wie das Auftreten Präeklampsie ähnlicher Symptome im Tiermodell verhindert werden kann. In einem nächsten Schritt könnte das Rekonstitutionspotential von VEGF untersucht werden. Die adenovirale Co-Expression würde dabei nicht parallel erfolgen, sondern zeitlich versetzt. So könnte am Beispiel der bereits aufgeführten Symptome der Rückgang dieser demonstriert werden. Eine ähnliche Studie erfolgte bereits. Darin wurden im Rattenmodell über adenovirale sFlt-1 Überexpression Präeklampsie ähnliche Läsionen gesetzt, und 7d nach Injektion der rekombinanten Adenoviren VEGF-A₁₂₁ Protein appliziert, mit einer Dosis von 400µg/kg/d (Li et. al. 2007). Aufgrund der stark blutdrucksenkenden Wirkung von VEGF-A wurde im genannten Modell die Gesamtmenge auf 6d verteilt angewandt. Da im vorliegenden Mausmodell sehr gute Resultate hinsichtlich der Bindung von freiem sFlt-1 nach VEGF-A₁₆₅ Co-Expression erreicht wurden, wäre es interessant zu sehen, ob die einmalige Applikation dieser Dosis an AdVEGF ebenfalls nach 7d ausreicht die zuvor induzierten Symptome zu rekonstituieren.

Eine weitere Studie nach dem Vorbild des vorliegenden Mausmodells könnte die Einflüsse der adenoviralen VEGF-A Überexpression auf die Niere und den Blutdruck untersuchen, und die Möglichkeit, diese Veränderungen durch Co-Expression von sFlt-1 zu neutralisieren.

Kürzlich wurde für den TGF-β1 Co-Rezeptor sEng eine mögliche Rolle bei der Symptomatik von Präeklampsie gezeigt (Venkatesha et. al. 2006). Diese Studie erfolgte am Rattenmodell und untersuchte ansatzweise die Inhibierung von VEGF-A durch die TGF-β1 Inaktivierung und den direkten Einfluß von sFlt-1. Ein Mausmodell mit adenoviraler Überexpression der

Inhibitoren sEng und sFlt-1, sowie der Liganden TGF- β 1 und VEGF-A könnte interessante Einblicke in die Regulation dieser Proteine und der damit verbundenen Effekte geben.

Die Entfernung von überschüssigem sFlt-1 aus der Zirkulation präeklaptischer Schwangerschaften stellt eine interessante Möglichkeit dar, der Entwicklung von Symptomen bei der Präeklampsie vorzubeugen. In den bereits beschriebenen durchgeführten Experimenten am hier etablierten Mausmodell wurde ein möglicher Mechanismus dazu vorgestellt, die Substitution von sFlt-1 durch VEGF-A₁₆₅ im Organismus. Ein weiterer Mechanismus der Neutralisierung dieses löslichen Inhibitors stellt die Depletion aus dem Plasma dar, die außerhalb des Körpers stattfinden könnte. Studien zur Depletion mit dem Plasma sFlt-1 behandelte Tiere zeigten eine deutliche Abnahme der sFlt-1 Konzentration sowohl nach dem Durchlauf einer mit VEGF-A₁₆₄ beladenen als auch einer mit anti-sFlt-1 Antikörper beladenen Säule um bis zu 45% (Abb. IV.54).

Zwar zeigten die *in-vivo* Versuche zur Substitution von sFlt-1 durch VEGF-A₁₆₅ einen deutlichen Rückgang der Symptome, und damit einen Hinweis auf ein therapeutisches Potential dieses Mechanismus. Jedoch übt VEGF-A einen starken regulatorischen Einfluß auf unterschiedliche Bereiche des Organismus aus, die gerade während einer Schwangerschaft sensibel reagieren. Der Eingriff in die angiogene Balance durch einen Hauptregulator wäre somit kritisch. Ein Beispiel dafür repräsentiert das Medikament Avastin®. Dieser anti-VEGF-A Antikörper wird zur Therapie des Dickdarmkarzinoms angewendet. Die umfangreiche Liste der Nebenwirkungen nennt neben Symptomen die ebenfalls bei Präeklampsie auftreten weitere pathologische Erscheinungen, die auf eine angiogene Dysfunktion hinweisen (Genentech, USA). Weitaus unkritischer erscheint daher die Möglichkeit sFlt-1 extern zu inaktivieren. Die Entfernung von sFlt-1 aus dem Blut über VEGF-A- oder anti-sFlt-1 Antikörper beladene Säulen außerhalb des Körpers ähnlich einer Dialyse repräsentiert eine interessante Alternative zur VEGF-A Applikation. Doch auch diese Methode weist Limitierungen auf, wie zum Beispiel das Bluten einer Säule. Dabei löst sich beispielsweise extern gebundenes VEGF-A aus der Säule und gelangt so in die Zirkulation der Mutter. Trotz der genannten Einschränkungen ist die Überlegung interessant sFlt-1 in der Präeklampsie zu inaktivieren. Zwar ist die Ursache der Krankheit nicht bekannt, und die Erkrankung kann nicht therapiert werden, jedoch kann das Abschwächen der Symptome besonders im schweren Verlauf die Schwangerschaft erleichtern, wenn nicht sogar einem Abort vorbeugen.

Die Methode der adenoviralen Überexpression in der Maus vereint die Vorteile einer effizienten viralen Genexpression mit denen eines Mausmodells. Das hier erstellte Modell kann zur Beantwortung einer Vielzahl von spannenden Fragestellungen genutzt werden, die lediglich eine geringe Anpassung erfordern.

IV Zusammenfassung

Die These, dass präeklampsische Symptome in der Mutter eine Folge der massiven Ausschüttung des angiogenen Inhibitors sFlt-1 durch die Plazenta sind, wurde durch Maynard et al. im Rattenmodell belegt (Maynard et al. 2003). Zu dieser Fragestellung sollte durch die vorliegende Arbeit ein Mausmodell entwickelt werden. Dabei sollten die grundsätzlich bei Präeklampsie auftretenden Symptome wie Hypertonie, Nierenschädigung und Proteinurie berücksichtigt werden.

Der erfolgreiche Transfer adenoviral kodierter Gene und deren Genprodukte konnte zunächst durch RT-PCR Produkte des Reporterproteins eGFP in der Leber behandelter Tiere belegt werden. Die Expression exogenen sFlt-1 Proteins wurde durch deutlich erhöhte Konzentrationen dieses Inhibitors in Leber, Plasma und Urin sFlt-1 –behandelter Tiere gezeigt, während die Konzentration in unbehandelten oder Kontrollvirus-behandelten Tieren vergleichsweise niedrig lag oder nicht nachweisbar war.

Als Folge adenoviraler sFlt-1 Überexpression konnten morphologische Veränderungen in der Niere beobachtet werden. Histologische Betrachtungen von Nierengewebe zeigten im Paraffinschnitt Veränderungen in der glomerulo-kapillären Morphologie sFlt-1 behandelter Tiere. Vertiefende Untersuchungen dieser Beobachtung durch elektronenmikroskopische Aufnahmen enthüllten starke Veränderungen in der Architektur des dreischichtigen glomerulären Filterapparates, die sich durch glomeruläre Endotheliose, sowie Fusion der Podozytenfortsätze auszeichneten. Diese Veränderungen konnten in Kontrollvirus behandelten Tieren nicht beobachtet werden.

Harnuntersuchungen hinsichtlich des Proteingehaltes AdsFlt-1-infizierter Tiere offenbarten einen starken Anstieg, insbesondere des Plasmaproteins Albumin. Dieses Protein wird im gesunden Zustand lediglich vereinzelt ausgeschieden. Eine erhöhte Akkumulation im Urin deutet auf eine glomeruläre Beeinträchtigung hin, die im vorliegenden Modell sehr wahrscheinlich als Folge der sFlt-1 induzierten renalen Effekte betrachtet werden kann. Diese Aussage konnte durch stichprobenartige Bestimmungen der glomerulären Filtrationsrate (Creatinin-Clearance) untermauert werden, die einen Anstieg in sFlt-1 behandelten Tieren zeigten.

Die Untersuchung des Blutdrucks an einzelnen Tieren und nach sFlt-1 Behandlung unterstützte die zuvor erhaltenen Resultate. So konnte ein signifikanter Blutdruckanstieg beobachtet werden, der in Kontrollvirus behandelten Tieren nicht auftrat.

Der Einfluß hoher sFlt-1 Konzentrationen im Organismus trächtiger Tiere sollte ebenfalls betrachtet werden. Da diese Evaluation widersprüchliche Resultate zeigte, wurde auf weitere, tiefer gehende Untersuchungen, auch aus ethischen Gesichtspunkten, verzichtet.

Die Bestätigung, dass sFlt-1 den Induktor präeklampscher Symptome im vorliegenden Mausmodell darstellt, sollte durch Inhibierungsversuche desselben belegt werden. Der überexprimierte lösliche Rezeptor sollte dabei zum Einen durch den Flt-1 blockierenden Antikörper KM1750, und zum Anderen durch seinen co-exprimierten Liganden VEGF gebunden und inaktiviert werden.

Die Funktionalität des blockierenden Flt-1 Antikörpers KM1750 konnte in Bindungsstudien *in-vitro* demonstriert werden. Im Tierversuch reichte die Affinität des Antikörpers jedoch nicht aus, den überexprimierten Inhibitor zu inaktivieren.

In Zellkulturexperimenten konnte *in-vitro* die Bindung von murinem sFlt-1 mFc durch humanes VEGF-A₁₆₅ demonstriert werden. Gleichzeitig offenbarten diese Versuche, dass angewandte kommerzielle ELISA-Testsysteme zur Bestimmung der Proteinkonzentration überwiegend das freie, ungebundene Protein erkennen, sowohl bei der Messung von sFlt-1 als auch bei der von VEGF-A. Wie kürzlich gezeigt, musste ein ELISA zum Nachweis von totalem VEGF erst etabliert werden (Li et al. 2007).

Bei der Inhibierung durch adenoviral co-exprimiertes VEGF wurden im experimentellen Tierversuch geringere Konzentrationen an AdsFlt-1 eingesetzt. Sie reichten aus um einen deutlichen Effekt zu induzieren, und waren an die geringe Menge AdVEGF angepasst, die angewendet werden musste um der letalen Wirkung des VEGF vorzubeugen.

Messungen von sFlt-1 in Leber, Plasma und Urin zeigten deutlich geringere Konzentrationen in co-infizierten Tieren, verglichen mit AdsFlt-1 infizierten Tieren.

Der gleiche Trend konnte bei der Intensität präeklampscher Symptome verfolgt werden. So wurde in der Nierenhistologie AdsFlt-1L infizierter Tiere eine starke Schädigung des Glomerulums beobachtet, ähnlich der bei separater sFlt-1 Überexpression (AdsFlt-1H), die in examinierten Nierenschnitten co-infizierter Tiere nicht auftrat.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Urin zeigte ein ähnliches Schema. Der Proteingehalt in co-behandelten Tieren war zwar immer noch höher als der in Kontrollvirus infizierten Tieren, jedoch signifikant niedriger im Vergleich zu AdsFlt-1L infizierten Tieren. Diese Ergebnisse wurden durch die Messung von Albumin, der Albumin/Creatinin-Ratio und der Creatinin-Clearance bestätigt.

Die stichprobenartige Blutdruckmessung zeigte ebenfalls keinen Anstieg bei co-exprimierten, im Vergleich zu AdsFlt-1L behandelten Tieren und kann so als weitere Bestätigung des bereits gezeigten Trends gedeutet werden.

Des weiteren wurden semiquantitative Analysen der Transkriptionsrate ausgewählter Gene durchgeführt, denen in diesem Mausmodell eine Bedeutung zugesprochen wurde, wie zum Beispiel Flt-1, VEGF-A oder die Schlitzmembran spezifischen Moleküle Nephrin und Podocin. Dabei wurde der unbehandelte Zustand, die sFlt-1 Überexpression und der Zustand der Co-Expression von sFlt-1 und VEGF-A miteinander verglichen. Die Analyse ergab keine Veränderung in der Regulation dieser Moleküle zwischen den einzelnen Zuständen.

Um einen möglichen therapeutischen Ansatz zu prüfen, wurden Experimente zur Bindung des sFlt-1 aus dem Plasma AdsFlt-1H behandelter Mäuse durchgeführt. Dabei wurden zwei Mechanismen untersucht, die Depletion aus dem Plasma und die Substitution in der Zirkulation. Es konnte gezeigt werden, dass die Entfernung dieses Inhibitors aus dem Plasma grundsätzlich über beide Mechanismen erfolgen kann.

Durch Versuche zur adenoviralen sFlt-1 Überexpression im Tiermodell konnten präeklampsische Symptome gezeigt werden. Diese wurden durch molekularbiologische und histologische, sowie durch protein-chemische und telemetrische Analysen des Modells belegt. Inhibierungsversuche mit co-exprimiertem VEGF bestätigten, dass tatsächlich sFlt-1 den Auslöser präeklampsischer Symptome im vorliegenden Mausmodell darstellt.

Diese Versuche zeigen ausserdem, dass der Anstieg des VEGF-Inhibitors sFlt-1 in der Zirkulation eine starke Veränderung und Belastung des Organismus darstellt.

VIII Anhang

1. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
293HEK	humane embryonale Nierenkarzinomzelllinie (human embryonic kidney)
A549	humane Lungenkarzinomzelllinie
Abb.	Abbildung
Ad C1 ieG	rek. Adenovirus, kodierend für IRES und ieG
Ad	Adenovirus
AdmsFlt-1mFc	rek. Adenovirus, kodierend für murines sFlt-1 mit murinem Fc-tag
AdsFlt-1H	Abkürzung für $7,5 \times 10^9$ pfu AdmsFlt-1mFc
AdsFlt-1L	Abkürzung für $3,5 \times 10^9$ pfu AdmsFlt-1mFc
AdVEGF	siehe AdVEGF-A ₁₆₅ ieG
AdVEGF-A ₁₆₅ ieG	rek. Adenovirus, kodierend für VEGF-A ₁₆₅ , mit IRES und eGFP
Balb/c	Bagg's Albino (Inzucht-Mausstamm)
BMP	Bone Morphogenetic Protein
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
eGFP	verstärktes grün fluoreszierendes Protein (enhanced green fluorescent protein)
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
Flt-1	= VEGFR-1
g	Gramm
h	Stunde
IRES	zusätzliche Ribosomenbindestelle (internal ribosomal entry site)
L	Liter
M	Molar
MEM	Modified Eagles Medium
min	Minute
MOI	multiplicity of infection
NO	Stickstoffmonoxid
PDGF-B	Platelet Derived Growth Factor B
pfu	Plaque bildende Einheit (plaque forming unit)
PlGF	Plazentarer Wachstumsfaktor
RNS	Ribonukleinsäure
scFv	einzelkettiger Antikörper (single chain fragment variable)
sEng	lösliches Endoglin, TGF- β Co-Rezeptor
sFlt-1	= sVEGFR-1
sVEGFR-1	löslicher vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor 1
Tab.	Tabelle
TGF- β	Transforming Growth Factor β
V	Volt
VEGF-A ₁₆₅	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A, Isoform 165
VEGFR-1	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor 1
VH	Antikörper: schwere Kette
VL	Antikörper: leichte Kette

2. Tabellen und Abbildungen

A Tabellen

Material und Methoden

III.1: Überblick der Primersequenzen zur Generation der Ketten	28
III.2: Überblick der Primersequenzen zum Nachweis von Transkripten	29
III.3: Überblick angewendeter Antikörper	29

Ergebnisse

IV.1: Skala zur Einordnung der histologischen Schädigung	80
--	----

B Abbildungen

Einleitung

I.1:	Der Aufbau des Uterus und der Plazenta	4
I.2:	Die VEGF-Familie und ihre Rezeptoren	10
I.3:	Die Genkarte des VEGFR-1	17
I.4:	Der schematische Aufbau der Niere	21
I.5:	Skizze eines Partikels eines Adenovirus	23

Material und Methoden

III.1:	Schematische Darstellung der Expressionskassetten angewandter Adenoviren	27
--------	--	----

Ergebnisse

IV.1:	Antikörperaktivität der Präimmun- und Immunseren aus immunisierten Mäusen	54
IV.2:	Amplifizierung der schweren (VH) und leichten (VL) Ketten, und Fusion dieser zum scFv-Basiskonstrukt	56
IV.3:	Mikroskopische Kontrolle der Funktionaliät rekombinanter Adenoviren die im Mausmodell eingesetzt wurden	61
IV.4:	Qualitativer Nachweis der Proteinexpression im Überstand adenoviral infizierter A549-Zellen	62
IV.5:	Quantitativer Nachweis der Proteinexpression in adenoviral infizierten A549-Zellen	63
IV.6:	Nachweis adenoviraler Transkripte in Lebergewebe	66
IV.7:	Flt-1 Konzentration im Leberlysats nach Infektion mit AdsFlt-1H	67
IV.8:	Flt-1 Konzentration im Plasma nach Infektion mit AdsFlt-1H	68
IV.9:	Flt-1 Konzentration im Plasma nach Infektion mit AdsFlt-1H: Vergleich von Tag 6 und Tag 10 des Experimentes	69
IV.10:	Flt-1 Konzentration in Nierenlysats nach Infektion mit AdsFlt-1H	70
IV.11:	Flt-1 Konzentration im Plasma nach Infektion mit AdsFlt-1H	71

IV.12: Flt-1 Konzentration im Leberlysat nach Infektion mit AdsFlt-1H nach Anwendung verschiedener Viruspräparationen	72
IV.12: Flt-1 Konzentration im Plasma nach Infektion mit AdsFlt-1H nach Anwendung verschiedener Viruspräparationen	73
IV.14: Makroskopische Veränderungen der Leber nach adenoviraler sFlt-1 Überexpression	74
IV.15: Vergleich der Lebermassen nach Anwendung von unterschiedlicher Viruspräparationen	75
IV.16: Histologie der Leber nach sFlt-1 Überexpression	76
IV.17: Makroskopische Veränderungen der Milz nach sFlt-1 Überexpression	77
IV.18: Histologie der Niere nach sFlt-1 Überexpression	79
IV.19: Histologischer Schädigungsgrad der Niere nach sFlt-1 Überexpression	81
IV.20: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Niere unbehandelter Tiere	83
IV.21: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Niere AdsFlt-1H behandelter Tiere	84
IV.22: Fragmentozyten und Erythrozytenstaub im Glomerulum AdsFlt-1H behandelter Tiere	85
IV.23: Histologie von Niere und Leber: Vergleich von Adenoviruspräparationen	87
IV.24: Nachweis von Gesamtprotein im Harn nach sFlt-1 Überexpression	88
IV.25: Nachweis von Gesamtprotein nach sFlt-1 Überexpression (weitere Proben)	89
IV.26: Nachweis von Albumin im 24h-Harn nach sFlt-1 Überexpression	90
IV.27: Creatinin-Clearance nach sFlt-1 Überexpression	91
IV.28: Mittlerer arterieller Blutdruck nach sFlt-1 Überexpression	93
IV.29: Blutdruck-Verlaufskurven nach sFlt-1 Überexpression	95
IV.30: Flt-1 Konzentration im Überstand adenoviral infizierter Zellen mit ansteigender Verdünnungsreihe an AdsFlt-1	99
IV.31: Flt-1 Konzentration im Zelllysat adenoviral infizierter Zellen mit ansteigender Verdünnungsreihe an AdsFlt-1	100
IV.32: VEGF- Konzentration im Überstand adenoviral infizierter Zellen mit ansteigender Verdünnungsreihe an AdsFlt-1	101
IV.33: VEGF- Konzentration im Überstand adenoviral infizierter Zellen mit ansteigender Verdünnungsreihe an AdVEGF	102
IV.34: VEGF- Konzentration im Zelllysat adenoviral infizierter Zellen mit ansteigender Verdünnungsreihe an AdVEGF	103

IV.35: Flt-1- Konzentration im Überstand adenoviral infizierter Zellen mit ansteigender Verdünnungsreihe an AdVEGF	104
IV.36: Flt-1- Konzentration im Zelllysate adenoviral infizierter Zellen mit ansteigender Verdünnungsreihe an AdVEGF	105
IV.37: Flt-1 Konzentration im Leberlysate nach Co-Infektion mit AdsFlt-1L/ AdVEGF	108
IV.38: Flt-1 Konzentration im Plasma nach Co-Infektion mit AdsFlt-1L/ AdVEGF	109
IV.39: Flt-1 Konzentration in Nierenlysate nach Co-Infektion mit AdsFlt-1L/ AdVEGF	110
IV.40: Flt-1 Konzentration im Urin nach Co-Infektion mit AdsFlt-1L/ AdVEGF	111
IV.41: Makroskopische Veränderungen der Leber nach adenoviraler Behandlung	112
IV.42: Makroskopische Veränderungen der Milz nach adenoviraler Behandlung	113
IV.43: Histologie der Niere nach Co-Infektion mit AdsFlt-1L/ AdVEGF	114
IV.44: Histologischer Schädigungsgrad der Niere nach Co-Infektion mit AdsFlt-1L/ AdVEGF	115
IV.45: Nachweis von Gesamtprotein im Harn nach Co-Infektion mit AdsFlt-1L/ AdVEGF	116
IV.46: Nachweis von Gesamtprotein im Harn nach Co-Infektion mit AdsFlt-1L/ AdVEGF (weitere Proben)	117
IV.47: Quantitativer Nachweis von Albumin im Harn nach Co-Infektion mit AdsFlt-1L/ AdVEGF	118
IV.48: Ratio Albumin/ Creatinin im Harn nach Co-Infektion mit AdsFlt-1L/ AdVEGF	119
IV.49: Creatinin-Clearance nach Co-Infektion mit AdsFlt-1L/ AdVEGF	120
IV.50: Mittlerer arterieller Blutdruck nach Co-Infektion mit AdsFlt-1L/ AdVEGF	121
IV.51: Blutdruck-Verlaufskurven nach Co-Infektion mit AdsFlt-1L/ AdVEGF	123
IV.52: Bestimmung der Affinität von Antikörpern	125
IV.53: Genexpression ausgewählter Gene nach sFlt-1 Überexpression und sFlt-1/ VEGF-A Co-Expression	127
IV.54: Depletion von sFlt-1 aus murinem Plasma	129
IV.55: Substitution von exprimiertem sFlt-1 mit co-exprimiertem VEGF im Tiermodell	130

3. Literaturverzeichnis

- Achen, M.G., Jeltsch, M., Kukk, E., Makinen, T., Vitali, A., Wilks, A.F., Alitalo, K., and Stacker, S.A. (1998). Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 548-553.
- Addya, S., Shioto, K., Turoczy, T., Zhan, L., Kaga, S., Fukuda, S., Surrey, S., Duan, L.J., Fong, G.H., Yamamoto, F., and Maulik, N. (2005). Ischemic preconditioning-mediated cardioprotection is disrupted in heterozygous Flt-1 (VEGFR-1) knockout mice. *J. Mol. Cell Cardiol.* 38, 345-351.
- Ahmad, S. and Ahmed, A. (2004). Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia. *Circ. Res.* 95, 884-891.
- Ahmed, A., Li, X.F., Dunk, C., Whittle, M.J., Rushton, D.I., and Rollason, T. (1995). Colocalisation of vascular endothelial growth factor and its Flt-1 receptor in human placenta. *Growth Factors* 12, 235-243.
- Ambati, B.K., Nozaki, M., Singh, N., Takeda, A., Jani, P.D., Suthar, T., Albuquerque, R.J., Richter, E., Sakurai, E., Newcomb, M.T., Kleinman, M.E., Caldwell, R.B., Lin, Q., Ogura, Y., Orecchia, A., Samuelson, D.A., Agnew, D.W., St Leger, J., Green, W.R., Mahasreshti, P.J., Curiel, D.T., Kwan, D., Marsh, H., Ikeda, S., Leiper, L.J., Collinson, J.M., Bogdanovich, S., Khurana, T.S., Shibuya, M., Baldwin, M.E., Ferrara, N., Gerber, H.P., De Falco, S., Witta, J., Baffi, J.Z., Raisler, B.J., and Ambati, J. (2006). Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature* 443, 993-997.
- Antignac, C., Gubler, M.C., Leverger, G., Broyer, M., and Habib, R. (1989). Delayed renal failure with extensive mesangiolytic following bone marrow transplantation. *Kidney Int.* 35, 1336-1344.
- Ballermann, B.J. (2007). Contribution of the endothelium to the glomerular permselectivity barrier in health and disease. *Nephron Physiol* 106, 19-25.
- Barbara, N.P., Wrana, J.L., and Letarte, M. (1999). Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J. Biol. Chem.* 274, 584-594.
- Barleon, B., Hauser, S., Schollmann, C., Weindel, K., Marme, D., Yayon, A., and Weich, H.A. (1994). Differential expression of the two VEGF receptors flt and KDR in placenta and vascular endothelial cells. *J. Cell Biochem.* 54, 56-66.
- Bates, D.O., Cui, T.G., Doughty, J.M., Winkler, M., Sugiono, M., Shields, J.D., Peat, D., Gillatt, D., and Harper, S.J. (2002). VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 62, 4123-4131.
- Baumwell, S. and Karumanchi, S.A. (2007). Pre-eclampsia: clinical manifestations and molecular mechanisms. *Nephron Clin. Pract.* 106, c72-c81.
- Berse, B., Brown, L.F., van de, W.L., Dvorak, H.F., and Senger, D.R. (1992). Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol. Biol. Cell* 3, 211-220.
- Betsholtz, C., Westermark, B., Ek, B., and Heldin, C.H. (1984). Coexpression of a PDGF-like growth factor and PDGF receptors in a human osteosarcoma cell line: implications for autocrine receptor activation. *Cell* 39, 447-457.
- Birnbaum, D. (1995). VEGF-FLT1 receptor system: a new ligand-receptor system involved in normal and tumor angiogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.* 86, inside.
- Bodnar, L.M., Catov, J.M., Simhan, H.N., Holick, M.F., Powers, R.W., and Roberts, J.M. (2007). Maternal vitamin D deficiency increases the risk of preeclampsia. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 92, 3517-3522.

- Boldicke,T., Tesar,M., Griesel,C., Rohde,M., Grone,H.J., Waltenberger,J., Kollet,O., Lapidot,T., Yayon,A., and Weich,H. (2001). Anti-VEGFR-2 scFvs for cell isolation. Single-chain antibodies recognizing the human vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2/flk-1) on the surface of primary endothelial cells and preselected CD34+ cells from cord blood. *Stem Cells* 19, 24-36.
- Brown,L.F., Berse,B., Tognazzi,K., Manseau,E.J., van de,W.L., Senger,D.R., Dvorak,H.F., and Rosen,S. (1992). Vascular permeability factor mRNA and protein expression in human kidney. *Kidney Int.* 42, 1457-1461.
- Canakci,V., Canakci,C.F., Yildirim,A., Ingeç,M., Eltas,A., and Erturk,A. (2007). Periodontal disease increases the risk of severe pre-eclampsia among pregnant women. *J. Clin. Periodontol.* 34, 639-645.
- Caniggia,I., Taylor,C.V., Ritchie,J.W., Lye,S.J., and Letarte,M. (1997). Endoglin regulates trophoblast differentiation along the invasive pathway in human placental villous explants. *Endocrinology* 138, 4977-4988.
- Carmeliet,P., Moons,L., Luttun,A., Vincenti,V., Compernelle,V., De Mol,M., Wu,Y., Bono,F., Devy,L., Beck,H., Scholz,D., Acker,T., DiPalma,T., Dewerchin,M., Noel,A., Stalmans,I., Barra,A., Blacher,S., Vandendriessche,T., Ponten,A., Eriksson,U., Plate,K.H., Foidart,J.M., Schaper,W., Charnock-Jones,D.S., Hicklin,D.J., Herbert,J.M., Collen,D., and Persico,M.G. (2001). Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat. Med.* 7, 575-583.
- Catov,J.M., Ness,R.B., Kip,K.E., and Olsen,J. (2007). Risk of early or severe pre-eclampsia related to pre-existing conditions. *Int. J. Epidemiol.* 36, 412-419.
- Chomczynski,P. and Sacchi,N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Clark,D.E., Smith,S.K., Sharkey,A.M., and Charnock-Jones,D.S. (1996). Localization of VEGF and expression of its receptors flt and KDR in human placenta throughout pregnancy. *Hum. Reprod.* 11, 1090-1098.
- Clauss,M., Weich,H., Breier,G., Knies,U., Rockl,W., Waltenberger,J., and Risau,W. (1996). The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 271, 17629-17634.
- Cohen,C.J., Shieh,J.T., Pickles,R.J., Okegawa,T., Hsieh,J.T., and Bergelson,J.M. (2001). The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 15191-15196.
- Compagni,A., Wilgenbus,P., Impagnatiello,M.A., Cotten,M., and Christofori,G. (2000). Fibroblast growth factors are required for efficient tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 60, 7163-7169.
- Connolly,D.T., Olander,J.V., Heuvelman,D., Nelson,R., Monsell,R., Siegel,N., Haymore,B.L., Leimgruber,R., and Feder,J. (1989). Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *J. Biol. Chem.* 264, 20017-20024.
- Cooper,J.C., Sharkey,A.M., McLaren,J., Charnock-Jones,D.S., and Smith,S.K. (1995). Localization of vascular endothelial growth factor and its receptor, flt, in human placenta and decidua by immunohistochemistry. *J. Reprod. Fertil.* 105, 205-213.
- Coultas,L., Chawengsaksophak,K., and Rossant,J. (2005). Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature* 438, 937-945.
- Crnic,I., Strittmatter,K., Cavallaro,U., Kopfstein,L., Jussila,L., Alitalo,K., and Christofori,G. (2004). Loss of neural cell adhesion molecule induces tumor metastasis by up-regulating lymphangiogenesis. *Cancer Res.* 64, 8630-8638.
- de Vries,C., Escobedo,J.A., Ueno,H., Houck,K., Ferrara,N., and Williams,L.T. (1992). The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255, 989-991.

- Dechend,R., Gratzke,P., Wallukat,G., Shagdarsuren,E., Plehm,R., Brasen,J.H., Fiebeler,A., Schneider,W., Caluwaerts,S., Vercruysse,L., Pijnenborg,R., Luft,F.C., and Muller,D.N. (2005). Agonistic autoantibodies to the AT1 receptor in a transgenic rat model of preeclampsia. *Hypertension* 45, 742-746.
- Demir,R., Kayisli,U.A., Seval,Y., Celik-Ozenci,C., Korgun,E.T., Demir-Weusten,A.Y., and Huppertz,B. (2004). Sequential expression of VEGF and its receptors in human placental villi during very early pregnancy: differences between placental vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta* 25, 560-572.
- Demir,R., Seval,Y., and Huppertz,B. (2007). Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. *Acta Histochem.* 109, 257-265.
- Ebos,J.M., Bocci,G., Man,S., Thorpe,P.E., Hicklin,D.J., Zhou,D., Jia,X., and Kerbel,R.S. (2004). A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Mol. Cancer Res.* 2, 315-326.
- Eming,S.A., Lauer,G., Cole,M., Jurk,S., Christ,H., Hornig,C., Krieg,T., and Weich,H.A. (2004). Increased levels of the soluble variant of the vascular endothelial growth factor receptor VEGFR-1 are associated with a poor prognosis in wound healing. *J. Invest Dermatol.* 123, 799-802.
- Engler,J.A. and van Bree,M.P. (1982). The nucleotide sequence of the gene encoding protein IVa2 in human adenovirus type 7. *Gene* 19, 71-80.
- Eremina,V., Cui,S., Gerber,H., Ferrara,N., Haigh,J., Nagy,A., Ema,M., Rossant,J., Jothy,S., Miner,J.H., and Quaggin,S.E. (2006). Vascular endothelial growth factor a signaling in the podocyte-endothelial compartment is required for mesangial cell migration and survival. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 724-735.
- Eremina,V., Sood,M., Haigh,J., Nagy,A., Lajoie,G., Ferrara,N., Gerber,H.P., Kikkawa,Y., Miner,J.H., and Quaggin,S.E. (2003). Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J. Clin. Invest* 111, 707-716.
- Failla,C.M., Odorisio,T., Cianfarani,F., Schietroma,C., Puddu,P., and Zambruno,G. (2000). Placenta growth factor is induced in human keratinocytes during wound healing. *J. Invest Dermatol.* 115, 388-395.
- Ferrara,N. (2004). Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist.* 9 Suppl 1, 2-10.
- Ferrara,N., Gerber,H.P., and LeCouter,J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 9, 669-676.
- Ferrara,N. and Henzel,W.J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 851-858.
- Ferrara,N., Winer,J., and Burton,T. (1991). Aortic smooth muscle cells express and secrete vascular endothelial growth factor. *Growth Factors* 5, 141-148.
- Fong,G.H., Rossant,J., Gertsenstein,M., and Breitman,M.L. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376, 66-70.
- Freeman,M.R., Schneck,F.X., Gagnon,M.L., Corless,C., Soker,S., Niknejad,K., Peoples,G.E., and Klagsbrun,M. (1995). Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis. *Cancer Res.* 55, 4140-4145.
- Gerber,H.P., Condorelli,F., Park,J., and Ferrara,N. (1997). Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 272, 23659-23667.
- Gilbert,J.S., Ryan,M.J., Lamarca,B.B., Sedeek,M., Murphy,S.R., and Granger,J.P. (2008). Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 294, H541-H550.
- Goerke K (2002). I.Trimenon. S.40-48. III.Trimenon S.152. In: Taschenatlas der Geburtshilfe. Thieme-Verlag.

- Goldman,J., Conley,K.A., Raehl,A., Bondy,D.M., Pytowski,B., Swartz,M.A., Rutkowski,J.M., Jaroch,D.B., and Ongstad,E.L. (2007). Regulation of lymphatic capillary regeneration by interstitial flow in skin. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 292, H2176-H2183.
- Gospodarowicz,D. and Lau,K. (1989). Pituitary follicular cells secrete both vascular endothelial growth factor and follistatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165, 292-298.
- Hara,A., Wada,T., Furuichi,K., Sakai,N., Kawachi,H., Shimizu,F., Shibuya,M., Matsushima,K., Yokoyama,H., Egashira,K., and Kaneko,S. (2006). Blockade of VEGF accelerates proteinuria, via decrease in nephrin expression in rat crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 69, 1986-1995.
- Harada,S., Rodan,S.B., and Rodan,G.A. (1995). Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in osteoblasts. *Clin. Orthop. Relat Res.* 76-80.
- Helske,S., Vuorela,P., Carpen,O., Hornig,C., Weich,H., and Halmesmaki,E. (2001). Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2 and 3 in placentas from normal and complicated pregnancies. *Mol. Hum. Reprod.* 7, 205-210.
- Herweijer,H. and Wolff,J.A. (2003). Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Ther.* 10, 453-458.
- Heyn G (2006). Präeklampsie und Infektion bedrohen Mutter und Kind. *Pharmazeutische Zeitung* 31.
- Hirashima,M., Lu,Y., Byers,L., and Rossant,J. (2003). Trophoblast expression of fms-like tyrosine kinase 1 is not required for the establishment of the maternal-fetal interface in the mouse placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 15637-15642.
- Hiratsuka,S., Minowa,O., Kuno,J., Noda,T., and Shibuya,M. (1998). Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 9349-9354.
- Holmes,D.I. and Zachary,I. (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biol.* 6, 209.
- Holmes,D.S. and Quigley,M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114, 193-197.
- Hoogenboom,H.R., Marks,J.D., Griffiths,A.D., and Winter,G. (1992). Building antibodies from their genes. *Immunol. Rev.* 130, 41-68.
- Hornig,C., Barleon,B., Ahmad,S., Vuorela,P., Ahmed,A., and Weich,H.A. (2000). Release and complex formation of soluble VEGFR-1 from endothelial cells and biological fluids. *Lab Invest* 80, 443-454.
- Hornig,C., Behn,T., Bartsch,W., Yayon,A., and Weich,H.A. (1999). Detection and quantification of complexed and free soluble human vascular endothelial growth factor receptor-1 (sVEGFR-1) by ELISA. *J. Immunol. Methods* 226, 169-177.
- Huang,K., Andersson,C., Roomans,G.M., Ito,N., and Claesson-Welsh,L. (2001). Signaling properties of VEGF receptor-1 and -2 homo- and heterodimers. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 315-324.
- Huber,A.B., Ehrenguber,M.U., Schwab,M.E., and Brosamle,C. (2000). Adenoviral gene transfer to the injured spinal cord of the adult rat. *Eur. J. Neurosci.* 12, 3437-3442.
- Hughes,D.C. (2001). Alternative splicing of the human VEGFR-3/FLT4 gene as a consequence of an integrated human endogenous retrovirus. *J. Mol. Evol.* 53, 77-79.
- Iruela-Arispe,M.L., Rodriguez-Manzanique,J.C., and Abu-Jawdeh,G. (1999). Endometrial endothelial cells express estrogen and progesterone receptors and exhibit a tissue specific response to angiogenic growth factors. *Microcirculation.* 6, 127-140.

- Jaffe,H.A., Danel,C., Longenecker,G., Metzger,M., Setoguchi,Y., Rosenfeld,M.A., Gant,T.W., Thorgeirsson,S.S., Stratford-Perricaudet,L.D., Perricaudet,M., and . (1992). Adenovirus-mediated in vivo gene transfer and expression in normal rat liver. *Nat. Genet.* 1, 372-378.
- Jin,X., Ge,X., Zhu,D.L., Yan,C., Chu,Y.F., Chen,W.D., Liu,J., and Gao,P.J. (2007). Expression and function of vascular endothelial growth factor receptors (Flt-1 and Flk-1) in vascular adventitial fibroblasts. *J. Mol. Cell Cardiol.* 43, 292-300.
- Joukov,V., Pajusola,K., Kaipainen,A., Chilov,D., Lahtinen,I., Kukk,E., Saksela,O., Kalkkinen,N., and Alitalo,K. (1996). A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* 15, 1751.
- Kaipainen,A., Korhonen,J., Mustonen,T., van Hinsbergh,V.W., Fang,G.H., Dumont,D., Breitman,M., and Alitalo,K. (1995). Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 3566-3570.
- Kalluri,R. (2006). Proteinuria with and without renal glomerular podocyte effacement. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 2383-2389.
- Kanno,S., Oda,N., Abe,M., Terai,Y., Ito,M., Shitara,K., Tabayashi,K., Shibuya,M., and Sato,Y. (2000). Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. *Oncogene* 19, 2138-2146.
- Karkkainen,M.J., Ferrell,R.E., Lawrence,E.C., Kimak,M.A., Levinson,K.L., McTigue,M.A., Alitalo,K., and Finegold,D.N. (2000). Missense mutations interfere with VEGFR-3 signalling in primary lymphoedema. *Nat. Genet.* 25, 153-159.
- Karkkainen,M.J., Haiko,P., Sainio,K., Partanen,J., Taipale,J., Petrova,T.V., Jeltsch,M., Jackson,D.G., Talikka,M., Rauvala,H., Betsholtz,C., and Alitalo,K. (2004). Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat. Immunol.* 5, 74-80.
- Karkkainen,M.J., Saaristo,A., Jussila,L., Karila,K.A., Lawrence,E.C., Pajusola,K., Bueler,H., Eichmann,A., Kauppinen,R., Kettunen,M.I., Yla-Herttuala,S., Finegold,D.N., Ferrell,R.E., and Alitalo,K. (2001). A model for gene therapy of human hereditary lymphedema. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 12677-12682.
- Karumanchi,S.A. and Epstein,F.H. (2007). Placental ischemia and soluble fms-like tyrosine kinase 1: cause or consequence of preeclampsia?. *Kidney Int.* 71, 959-961.
- Kaufmann,P. (1993). 11.Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg
- Kendall,R.L. and Thomas,K.A. (1993). Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 10705-10709.
- Kennedy,M., Firpo,M., Choi,K., Wall,C., Robertson,S., Kabrun,N., and Keller,G. (1997). A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature* 386, 488-493.
- Koga,K., Osuga,Y., Yoshino,O., Hirota,Y., Ruimeng,X., Hirata,T., Takeda,S., Yano,T., Tsutsumi,O., and Taketani,Y. (2003). Elevated serum soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (sVEGFR-1) levels in women with preeclampsia. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 88, 2348-2351.
- Koitabashi,Y., Rosenberg,B.F., Shapiro,H., and Bernstein,J. (1991). Mesangiolysis: an important glomerular lesion in thrombotic microangiopathy. *Mod. Pathol.* 4, 161-166.
- Kremer,C., Breier,G., Risau,W., and Plate,K.H. (1997). Up-regulation of flk-1/vascular endothelial growth factor receptor 2 by its ligand in a cerebral slice culture system. *Cancer Res.* 57, 3852-3859.
- Kroll,J. and Waltenberger,J. (2000). [Regulation of the endothelial function and angiogenesis by vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A)]. *Z. Kardiol.* 89, 206-218.
- LeCouter,J., Moritz,D.R., Li,B., Phillips,G.L., Liang,X.H., Gerber,H.P., Hillan,K.J., and Ferrara,N. (2003). Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* 299, 890-893.

- Lee,S., Chen,T.T., Barber,C.L., Jordan,M.C., Murdock,J., Desai,S., Ferrara,N., Nagy,A., Roos,K.P., and Iruela-Arispe,M.L. (2007). Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell* 130, 691-703.
- Leung,D.W., Cachianes,G., Kuang,W.J., Goeddel,D.V., and Ferrara,N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246, 1306-1309.
- Leveen,P., Pekny,M., Gebre-Medhin,S., Swolin,B., Larsson,E., and Betsholtz,C. (1994). Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev.* 8, 1875-1887.
- Levine,R.J., Lam,C., Qian,C., Yu,K.F., Maynard,S.E., Sachs,B.P., Sibai,B.M., Epstein,F.H., Romero,R., Thadhani,R., and Karumanchi,S.A. (2006). Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* 355, 992-1005.
- Levine,R.J., Maynard,S.E., Qian,C., Lim,K.H., England,L.J., Yu,K.F., Schisterman,E.F., Thadhani,R., Sachs,B.P., Epstein,F.H., Sibai,B.M., Sukhatme,V.P., and Karumanchi,S.A. (2004). Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* 350, 672-683.
- Li,H.J., Everts,M., Pereboeva,L., Komarova,S., Idan,A., Curiel,D.T., and Herschman,H.R. (2007a). Adenovirus tumor targeting and hepatic untargeting by a coxsackie/adenovirus receptor ectodomain anti-carcinoembryonic antigen bispecific adapter. *Cancer Res.* 67, 5354-5361.
- Li,Z., Zhang,Y., Ying,M.J., Kapoun,A.M., Shao,Q., Kerr,I., Lam,A., O'Young,G., Sannajust,F., Stathis,P., Schreiner,G., Karumanchi,S.A., Protter,A.A., and Pollitt,N.S. (2007b). Recombinant vascular endothelial growth factor 121 attenuates hypertension and improves kidney damage in a rat model of preeclampsia. *Hypertension* 50, 686-692.
- Lieber,A., He,C.Y., Meuse,L., Schowalter,D., Kirillova,I., Winther,B., and Kay,M.A. (1997). The role of Kupffer cell activation and viral gene expression in early liver toxicity after infusion of recombinant adenovirus vectors. *J. Virol.* 71, 8798-8807.
- Liu,H.S., Jan,M.S., Chou,C.K., Chen,P.H., and Ke,N.J. (1999). Is green fluorescent protein toxic to the living cells?. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260, 712-717.
- Louis,N., Eveleigh,C., and Graham,F.L. (1997). Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology* 233, 423-429.
- Lu,F., Longo,M., Tamayo,E., Maner,W., Al Hendy,A., Anderson,G.D., Hankins,G.D., and Saade,G.R. (2007). The effect of over-expression of sFlt-1 on blood pressure and the occurrence of other manifestations of preeclampsia in unrestrained conscious pregnant mice. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 196, 396-397.
- Machens,H.G., Morgan,J.R., Sachse,C., Berger,A.C., and Mailander,P. (2000). [Gene therapy possibilities in plastic surgery]. *Chirurg* 71, 152-158.
- Maharaj,A.S., Saint-Geniez,M., Maldonado,A.E., and D'Amore,P.A. (2006). Vascular endothelial growth factor localization in the adult. *Am. J. Pathol.* 168, 639-648.
- Mahasreshti,P.J., Kataram,M., Wang,M.H., Stockard,C.R., Grizzle,W.E., Carey,D., Siegal,G.P., Haisma,H.J., Alvarez,R.D., and Curiel,D.T. (2003). Intravenous delivery of adenovirus-mediated soluble FLT-1 results in liver toxicity. *Clin. Cancer Res.* 9, 2701-2710.
- Makinen,T., Veikkola,T., Mustjoki,S., Karpanen,T., Catimel,B., Nice,E.C., Wise,L., Mercer,A., Kowalski,H., Kerjaschki,D., Stacker,S.A., Achen,M.G., and Alitalo,K. (2001). Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO J.* 20, 4762-4773.
- Makris,A., Thornton,C., Thompson,J., Thomson,S., Martin,R., Ogle,R., Waugh,R., McKenzie,P., Kirwan,P., and Hennessy,A. (2007). Uteroplacental ischemia results in proteinuric hypertension and elevated sFLT-1. *Kidney Int.* 71, 977-984.
- Mathor,M.B., Ferrari,G., Dellambra,E., Cilli,M., Mavilio,F., Cancedda,R., and De Luca,M. (1996). Clonal analysis of stably transduced human epidermal stem cells in culture.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 93, 10371-10376.

Matsubara,K., Nagamatsu,T., Fujii,T., Kozuma,S., and Taketani,Y. (2005). Lymphokine-activated killer cells induced from decidual lymphocytes reduce the angiogenic activity of trophoblasts by enhancing the release of soluble fms-like tyrosine kinase-1 from trophoblasts: an implication for the pathophysiology of preeclampsia. *J. Reprod. Immunol.* 68, 27-37.

Matsumoto,T. and Claesson-Welsh,L. (2001). VEGF receptor signal transduction. *Sci. STKE.* 2001, RE21.

Matsushita,T., Elliger,S., Elliger,C., Podsakoff,G., Villarreal,L., Kurtzman,G.J., Iwaki,Y., and Colosi,P. (1998). Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Ther.* 5, 938-945.

Matthiesen,L., Berg,G., Ernerudh,J., Ekerfelt,C., Jonsson,Y., and Sharma,S. (2005). Immunology of preeclampsia. *Chem. Immunol. Allergy* 89, 49-61.

Mayer,H., Bertram,H., Lindenmaier,W., Korff,T., Weber,H., and Weich,H. (2005). Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells: autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation. *J. Cell Biochem.* 95, 827-839.

Maynard,S.E., Min,J.Y., Merchan,J., Lim,K.H., Li,J., Mondal,S., Libermann,T.A., Morgan,J.P., Sellke,F.W., Stillman,I.E., Epstein,F.H., Sukhatme,V.P., and Karumanchi,S.A. (2003). Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J. Clin. Invest* 111, 649-658.

McAllister,K.A., Grogg,K.M., Johnson,D.W., Gallione,C.J., Baldwin,M.A., Jackson,C.E., Helmbold,E.A., Markel,D.S., McKinnon,W.C., Murrell,J., and . (1994). Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat. Genet.* 8, 345-351.

McCafferty J, Hoogenboom HR, and Chiswell DJ (1996). Antibody Engineering. Practical Approach Series.

Modrow S and Falke D (1998). Molekulare Virologie. Spektrum Akademischer Verlag).

Moran,P., Lindheimer,M.D., and Davison,J.M. (2004). The renal response to preeclampsia. *Semin. Nephrol.* 24, 588-595.

Morsy,M.A. and Caskey,C.T. (1999). Expanded-capacity adenoviral vectors--the helper-dependent vectors. *Mol. Med. Today* 5, 18-24.

Mould,A.W., Tonks,I.D., Cahill,M.M., Pettit,A.R., Thomas,R., Hayward,N.K., and Kay,G.F. (2003). Vegfb gene knockout mice display reduced pathology and synovial angiogenesis in both antigen-induced and collagen-induced models of arthritis. *Arthritis Rheum.* 48, 2660-2669.

Murakami,M., Imahori,Y., Kimura,S., Tatsuzawa,K., Ohwada,K., Inoue,Y., Sasajima,H., and Mineura,K. (2005). Positron emission tomography elucidates transport system and tumor proliferation in meningiomas. *Oncol. Rep.* 14, 853-859.

Murakami,M., Iwai,S., Hiratsuka,S., Yamauchi,M., Nakamura,K., Iwakura,Y., and Shibuya,M. (2006). Signaling of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine kinase promotes rheumatoid arthritis through activation of monocytes/macrophages. *Blood* 108, 1849-1856.

Nagamatsu,T., Fujii,T., Kusumi,M., Zou,L., Yamashita,T., Osuga,Y., Momoeda,M., Kozuma,S., and Taketani,Y. (2004). Cytotrophoblasts up-regulate soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression under reduced oxygen: an implication for the placental vascular development and the pathophysiology of preeclampsia. *Endocrinology* 145, 4838-4845.

Nagy,J.A., Vasile,E., Feng,D., Sundberg,C., Brown,L.F., Detmar,M.J., Lawitts,J.A., Benjamin,L., Tan,X., Manseau,E.J., Dvorak,A.M., and Dvorak,H.F. (2002). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J. Exp. Med.* 196, 1497-1506.

- Olofsson,B., Korpelainen,E., Pepper,M.S., Mandriota,S.J., Aase,K., Kumar,V., Gunji,Y., Jeltsch,M.M., Shibuya,M., Alitalo,K., and Eriksson,U. (1998). Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 11709-11714.
- Otrock,Z.K., Makarem,J.A., and Shamseddine,A.I. (2007). Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells Mol. Dis.* 38, 258-268.
- Pajusola,K., Aprelikova,O., Armstrong,E., Morris,S., and Alitalo,K. (1993). Two human FLT4 receptor tyrosine kinase isoforms with distinct carboxy terminal tails are produced by alternative processing of primary transcripts. *Oncogene* 8, 2931-2937.
- Pajusola,K., Aprelikova,O., Pelicci,G., Weich,H., Claesson-Welsh,L., and Alitalo,K. (1994). Signalling properties of FLT4, a proteolytically processed receptor tyrosine kinase related to two VEGF receptors. *Oncogene* 9, 3545-3555.
- Park,J.E., Chen,H.H., Winer,J., Houck,K.A., and Ferrara,N. (1994). Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J. Biol. Chem.* 269, 25646-25654.
- Partanen,T.A., Makinen,T., Arola,J., Suda,T., Weich,H.A., and Alitalo,K. (1999). Endothelial growth factor receptors in human fetal heart. *Circulation* 100, 583-586.
- Rafii,S., Heissig,B., and Hattori,K. (2002). Efficient mobilization and recruitment of marrow-derived endothelial and hematopoietic stem cells by adenoviral vectors expressing angiogenic factors. *Gene Ther.* 9, 631-641.
- Rajakumar,A., Michael,H.M., Rajakumar,P.A., Shibata,E., Hubel,C.A., Karumanchi,S.A., Thadhani,R., Wolf,M., Harger,G., and Markovic,N. (2005). Extra-placental expression of vascular endothelial growth factor receptor-1, (Flt-1) and soluble Flt-1 (sFlt-1), by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in normotensive and preeclamptic pregnant women. *Placenta* 26, 563-573.
- Ramsauer,M. and D'Amore,P.A. (2002). Getting Tie(2)d up in angiogenesis. *J. Clin. Invest* 110, 1615-1617.
- Rissanen,T.T., Markkanen,J.E., Gruchala,M., Heikura,T., Puranen,A., Kettunen,M.I., Kholova,I., Kauppinen,R.A., Achen,M.G., Stacker,S.A., Alitalo,K., and Yla-Herttuala,S. (2003). VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses. *Circ. Res.* 92, 1098-1106.
- Roberts,J.M. and Gammill,H.S. (2005). Preeclampsia: recent insights. *Hypertension* 46, 1243-1249.
- Roy,H., Bhardwaj,S., Babu,M., Jauhiainen,S., Herzig,K.H., Bellu,A.R., Haisma,H.J., Carmeliet,P., Alitalo,K., and Yla-Herttuala,S. (2005). Adenovirus-mediated gene transfer of placental growth factor to perivascular tissue induces angiogenesis via upregulation of the expression of endogenous vascular endothelial growth factor-A. *Hum. Gene Ther.* 16, 1422-1428.
- Saaristo,A., Veikkola,T., Enholm,B., Hytonen,M., Arola,J., Pajusola,K., Turunen,P., Jeltsch,M., Karkkainen,M.J., Kerjaschki,D., Bueler,H., Yla-Herttuala,S., and Alitalo,K. (2002). Adenoviral VEGF-C overexpression induces blood vessel enlargement, tortuosity, and leakiness but no sprouting angiogenesis in the skin or mucous membranes. *FASEB J.* 16, 1041-1049.
- Saldarelli,P., Keller,H., Dell'Orco,M., Schots,A., Elicio,V., and Minafra,A. (2005). Isolation of recombinant antibodies (scFvs) to grapevine virus B. *J. Virol. Methods* 124, 191-195.
- Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory).
- Sawano,A., Iwai,S., Sakurai,Y., Ito,M., Shitara,K., Nakahata,T., and Shibuya,M. (2001). Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood* 97, 785-791.

- Schlager,G. (1968). Kidney weight in mice: strain differences and genetic determination. *J. Hered.* 59, 171-174.
- Senger,D.R., Galli,S.J., Dvorak,A.M., Perruzzi,C.A., Harvey,V.S., and Dvorak,H.F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219, 983-985.
- Senger,D.R., van de,W.L., Brown,L.F., Nagy,J.A., Yeo,K.T., Yeo,T.K., Berse,B., Jackman,R.W., Dvorak,A.M., and Dvorak,H.F. (1993). Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev.* 12, 303-324.
- Shah,D.M. (2007). Preeclampsia: new insights. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 16, 213-220.
- Shalaby,F., Rossant,J., Yamaguchi,T.P., Gertsenstein,M., Wu,X.F., Breitman,M.L., and Schuh,A.C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376, 62-66.
- Shibuya,M. (2001a). Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 409-420.
- Shibuya,M. (2001b). Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct. Funct.* 26, 25-35.
- Shibuya,M. (2006a). Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J. Biochem. Mol. Biol.* 39, 469-478.
- Shibuya,M. (2006b). Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis.* 9, 225-230.
- Shibuya,M. and Claesson-Welsh,L. (2006). Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp. Cell Res.* 312, 549-560.
- Shifren,J.L., Doldi,N., Ferrara,N., Mesiano,S., and Jaffe,R.B. (1994). In the human fetus, vascular endothelial growth factor is expressed in epithelial cells and myocytes, but not vascular endothelium: implications for mode of action. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 79, 316-322.
- Shima,D.T., Deutsch,U., and D'Amore,P.A. (1995). Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability. *FEBS Lett.* 370, 203-208.
- Shimizu,A., Masuda,Y., Mori,T., Kitamura,H., Ishizaki,M., Sugisaki,Y., and Fukuda,Y. (2004). Vascular endothelial growth factor165 resolves glomerular inflammation and accelerates glomerular capillary repair in rat anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15, 2655-2665.
- Sibai,B., Dekker,G., and Kupferminc,M. (2005). Pre-eclampsia. *Lancet* 365, 785-799.
- Soriano,P. (1994). Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev.* 8, 1888-1896.
- Spearman C and Kärber G (1974). *Virologische Arbeitsmethoden.*, Bibrack BWG, ed.
- Stacker,S.A., Caesar,C., Baldwin,M.E., Thornton,G.E., Williams,R.A., Prevo,R., Jackson,D.G., Nishikawa,S., Kubo,H., and Achen,M.G. (2001). VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat. Med.* 7, 186-191.
- Staff,A.C., Braekke,K., Harsem,N.K., Lyberg,T., and Holthe,M.R. (2005). Circulating concentrations of sFlt1 (soluble fms-like tyrosine kinase 1) in fetal and maternal serum during pre-eclampsia. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 122, 33-39.
- Stillman,I.E. and Karumanchi,S.A. (2007). The glomerular injury of preeclampsia. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 2281-2284.

- Sugimoto,H., Hamano,Y., Charytan,D., Cosgrove,D., Kieran,M., Sudhakar,A., and Kalluri,R. (2003). Neutralization of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) by anti-VEGF antibodies and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) induces proteinuria. *J. Biol. Chem.* 278, 12605-12608.
- Sugino,N., Kashida,S., Karube-Harada,A., Takiguchi,S., and Kato,H. (2002). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Reproduction.* 123, 379-387.
- Suto,K., Yamazaki,Y., Morita,T., and Mizuno,H. (2005). Crystal structures of novel vascular endothelial growth factors (VEGF) from snake venoms: insight into selective VEGF binding to kinase insert domain-containing receptor but not to fms-like tyrosine kinase-1. *J. Biol. Chem.* 280, 2126-2131.
- Tagawa,H., Hayakawa,M., Shibata,Y., Fukushima,K., Lee,M.S., Shiroza,T., and Abiko,Y. (2004). Production of functional ScFv inhibiting *Streptococcus mutans* glucosyltransferase activity from a hybridoma P126. *Hybrid. Hybridomics.* 23, 305-310.
- Takahashi,H. and Shibuya,M. (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin. Sci. (Lond)* 109, 227-241.
- Takahashi,T., Shirasawa,T., Miyake,K., Yahagi,Y., Maruyama,N., Kasahara,N., Kawamura,T., Matsumura,O., Mitarai,T., and Sakai,O. (1995). Protein tyrosine kinases expressed in glomeruli and cultured glomerular cells: Flt-1 and VEGF expression in renal mesangial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209, 218-226.
- Takahashi,T., Yamaguchi,S., Chida,K., and Shibuya,M. (2001). A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J.* 20, 2768-2778.
- Tammela,T., Enholm,B., Alitalo,K., and Paavonen,K. (2005). The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc. Res.* 65, 550-563.
- Thirunavukkarasu,M., Juhasz,B., Zhan,L., Menon,V.P., Tosaki,A., Otani,H., and Maulik,N. (2007). VEGFR1 (Flt-1+/-) gene knockout leads to the disruption of VEGF-mediated signaling through the nitric oxide/heme oxygenase pathway in ischemic preconditioned myocardium. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 1487-1495.
- Thomas,S., Vanuystel,J., Gruden,G., Rodriguez,V., Burt,D., Gnudi,L., Hartley,B., and Viberti,G. (2000). Vascular endothelial growth factor receptors in human mesangium in vitro and in glomerular disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11, 1236-1243.
- Thurston,G., Rudge,J.S., Ioffe,E., Zhou,H., Ross,L., Croll,S.D., Glazer,N., Holash,J., McDonald,D.M., and Yancopoulos,G.D. (2000). Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat. Med.* 6, 460-463.
- Toi,M., Bando,H., Ogawa,T., Muta,M., Hornig,C., and Weich,H.A. (2002). Significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)/soluble VEGF receptor-1 relationship in breast cancer. *Int. J. Cancer* 98, 14-18.
- Torry,D.S., Mukherjea,D., Arroyo,J., and Torry,R.J. (2003). Expression and function of placenta growth factor: implications for abnormal placentation. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 10, 178-188.
- Tsatsaris,V., Goffin,F., Munaut,C., Brichant,J.F., Pignon,M.R., Noel,A., Schaaps,J.P., Cabrol,D., Frankenne,F., and Foidart,J.M. (2003). Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 88, 5555-5563.
- Tuder,R.M., Flook,B.E., and Voelkel,N.F. (1995). Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J. Clin. Invest* 95, 1798-1807.
- Valtola,R., Salven,P., Heikkila,P., Taipale,J., Joensuu,H., Rehn,M., Pihlajaniemi,T., Weich,H., deWaal,R., and Alitalo,K. (1999). VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *Am. J. Pathol.* 154, 1381-1390.

van Dijk,M., Mulders,J., Poutsma,A., Konst,A.A., Lachmeijer,A.M., Dekker,G.A., Blankenstein,M.A., and Oudejans,C.B. (2005). Maternal segregation of the Dutch preeclampsia locus at 10q22 with a new member of the winged helix gene family. *Nat. Genet.* 37, 514-519.

Veikkola,T., Jussila,L., Makinen,T., Karpanen,T., Jeltsch,M., Petrova,T.V., Kubo,H., Thurston,G., McDonald,D.M., Achen,M.G., Stackel,S.A., and Alitalo,K. (2001). Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J.* 20, 1223-1231.

Veikkola,T., Karkkainen,M., Claesson-Welsh,L., and Alitalo,K. (2000). Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res.* 60, 203-212.

Venkatesha,S., Toporsian,M., Lam,C., Hanai,J., Mammoto,T., Kim,Y.M., Bdolah,Y., Lim,K.H., Yuan,H.T., Libermann,T.A., Stillman,I.E., Roberts,D., D'Amore,P.A., Epstein,F.H., Sellke,F.W., Romero,R., Sukhatme,V.P., Letarte,M., and Karumanchi,S.A. (2006). Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat. Med.* 12, 642-649.

Viac,J., Palacio,S., Schmitt,D., and Claudy,A. (1997). Expression of vascular endothelial growth factor in normal epidermis, epithelial tumors and cultured keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.* 289, 158-163.

Volm,M., Koomagi,R., and Mattern,J. (1997). Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in squamous cell lung cancer. *Int. J. Cancer* 74, 64-68.

Yang,J.C., Haworth,L., Sherry,R.M., Hwu,P., Schwartzentruber,D.J., Topalian,S.L., Steinberg,S.M., Chen,H.X., and Rosenberg,S.A. (2003). A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N. Engl. J. Med.* 349, 427-434.

Yang,Y., Nunes,F.A., Berencsi,K., Furth,E.E., Gonczol,E., and Wilson,J.M. (1994). Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 4407-4411.

Zhou,Y., Damsky,C.H., and Fisher,S.J. (1997a). Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome?. *J. Clin. Invest* 99, 2152-2164.

Zhou,Y., Fisher,S.J., Janatpour,M., Genbacev,O., Dejana,E., Wheelock,M., and Damsky,C.H. (1997b). Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J. Clin. Invest* 99, 2139-2151.

Zhou,Y., McMaster,M., Woo,K., Janatpour,M., Perry,J., Karpanen,T., Alitalo,K., Damsky,C., and Fisher,S.J. (2002). Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am. J. Pathol.* 160, 1405-1423.

4. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Genregulation und Differenzierung am Helmholtz Institut für Infektionsforschung durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Herbert A. Weich für die Bereitstellung dieses spannenden Themas, die Betreuung meiner Arbeit, sowie für stets vorhandene Diskussionsbereitschaft und zahlreiche Möglichkeiten zur wissenschaftlichen Entfaltung.

Des Weiteren danke ich Herrn PD Dr. Gerhard Gross für die Übernahme des Erstreferats, Herrn Prof. Dr. Jürgen Wehland für die Übernahme des Zweitreferats und Herrn Prof. Dr. Ralf R. Mendel für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Mein Dank geht weiterhin an alle Kollegen und Freunde der gesamten Arbeitsgruppe. Durch das sehr angenehme Arbeitsklima, sowie durch die stete Hilfsbereitschaft jedes Einzelnen wird mir die Doktorarbeit für immer in schöner Erinnerung bleiben.

Mein besonderer Dank gilt dabei Brigitte Pawletta für die Durchführung von umfangreichen ELISA-Messungen, sowie Renate Bohnewald und Karin Littmann-Jansen für die Einarbeitung bei der Adenovirenherstellung.

Mein allerherzlichster Dank gilt meinem Freund Tobias der mich mit viel Geduld unterstützte, und mit mir die Höhen und Tiefen dieser Arbeit durchstand. Herzlich bedanken möchte ich mich ebenfalls bei meinen Eltern und meiner Familie, die stets für mich da waren und mich selbstlos unterstützten. Euer Beistand hat es mir möglich gemacht dies alles zu erreichen.